

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Imunologie



Bc. Markéta Šilhová

Určení dárcovsky specifické T buněčné aloreaktivity u pacientů po transplantaci ledviny
s diagnózou hraničních změn

Donor specific T cell alloreactivity in kidney transplant recipients with borderline
changes

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Petra Hrubá, PhD.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1. 1. 2020

Podpis

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat prof. MUDr. Ondřeji Viklickému, CSc., že mi bylo umožněno pracovat v Transplantační laboratoři v IKEMU. Také bych chtěla poděkovat lékařům Kliniky nefrologie, že nám zařazovali pacienty. Chtěla bych také poděkovat za možnost vypracování diplomové práce, za odborné vedení a cenné rady mé vedoucí diplomové práce, Mgr. Petře Hrubé, Ph.D., a za technickou a administrativní pomoc při laboratorních metodách Mgr. Janě Machkové, Mgr. Lucii Straňavové a Bc. Barboře Kronosové. Děkuji také rodičům za trpělivost v průběhu mého celého studia.

Abstrakt

Po transplantaci ledviny imunitní systém příjemce reaguje na antigeny dárce a dochází k odhojování štěpu (reakci). Častým biotickým nálezem po transplantaci ledviny jsou hraniční změny, považované za předstupeň reakce. U části pacientů s hraničními změnami dojde k progresi do reakce. Identifikace těchto rizikových pacientů pomocí biomarkerů by umožnila úpravu léčby a pomohla zabránit rozvoji reakce.

Cílem mé práce bylo ověřit biomarkery rozvoje reakce u pacientů s diagnózou hraničních změn. ELISOU jsme stanovili chemokiny CXCL9, CXCL10 a CCL17 v moči/séru u pacientů s diagnózou subklinických hraničních změn ve 3. měsíci (n=40) a u pacientů s časnými hraničními změnami (n=25). Ve 3. měsíci, vyšší hladina CXCL10 predikovala reakci s AUC=0,749, p=0,024. Vysoká hladina CXCL10 byla zjištěna také u pacientů s BKV infekcí. U CXCL9 a CCL17 jsme vztah k reakci nepotvrdili. U časných hraničních změn byla hladina CXCL10 i CXCL9 zvýšena u pacientů, kteří rozvinuli reakci, i u pacientů bez reakce, proto je nelze použít k predikci reakce. Alloreaktivita u pacientů byla stanovena testem IFN- γ ELISPOT (n=38). Nepodařilo se nám prokázat souvislost mezi frekvencí buněk produkujících IFN- γ po stimulaci buňkami dárce či CMV peptidy na rozvoj reakce.

CXCL10 v moči je nadějným biomarkerem rizika rozvoje reakce po subklinických hraničních změnách ve 3. měsíci.

Klíčová slova Transplantace, hraniční změny, ELISPOT, ELISA, IFN- γ , CXCL10, CXCL9, CCL17

Abstract

After kidney transplantation the recipient's immune system responds to the donor's antigens and the graft rejection occurs. Borderline changes are a frequent diagnosis after kidney transplantation, representing only mild rejection signs. Some patients with borderline changes undergo progression to rejection. The identification of these at-risk patients by biomarkers will allow enhanced treatment and help to prevent the development of rejection.

The aim of my work was to verify biomarkers of rejection in patients with borderline changes. Chemokines CXCL9, CXCL10 and CCL17 in urine/serum of 40 patients with subclinical borderline changes at 3 months and in 25 patients with early borderline changes were determined by ELISA. At 3 months, the higher CXCL10 level predicted rejection with AUC=0.749, $p=0.024$. High levels of CXCL10 had also been found in patients with BKV infection. We did not confirm the relationship between rejection and the CXCL9 and CCL17. In the early posttransplant period the levels of CXCL10 and CXCL9 were elevated in all patients and therefore couldn't be used to predict rejection. The alloreactivity was examined using IFN- γ ELISPOT ($n=38$). No association between the frequency of IFN- γ producing cells after stimulation with donor cells or CMV peptides and the development of rejection was found.

CXCL10 in urine is a noninvasive biomarker of the risk of rejection after subclinical borderline changes at 3 months.

Key words Transplantation, borderline changes, ELISPOT, ELISA, IFN- γ , CXCL10, CXCL9, CCL17

Obsah

1	Úvod	7
2	Literární přehled.....	8
2.1	HLA systém	8
2.1.1	HLA antigeny I. třídy	8
2.1.2	HLA antigeny II. třídy.....	9
2.1.3	Anti-HLA protilátky.....	10
2.2	Vyšetřovací metody stanovení imunologického rizika před transplantací	10
2.2.1	Panel-reaktivní protilátky (PRA)	10
2.2.2	Crossmatch	11
2.2.3	Donor specifické protilátky (DSA).....	11
2.3	Imunitní odpověď proti allotransplantátu.....	12
2.3.1	Přírozená imunitní odpověď	12
2.3.2	Adaptivní imunitní odpověď a mechanismy rozpoznávání HLA antigenů	13
2.4	Rejekce štěpu	15
2.4.1	Akutní rejekce – zprostředkovaná T lymfocyty (TCMR)	16
2.4.2	Akutní rejekce – protilátkově zprostředkovaná rejekce (ABMR)	17
2.4.3	Chronická rejekce – protilátkově zprostředkovaná rejekce.....	18
2.4.4	Chronická rejekce – zprostředkovaná T lymfocyty	19
2.5	Banffská klasifikace	20
2.5.1	Hraniční změny.....	22
2.6	Cytokiny jako významné biomarkery rejekce	23
2.6.1	Interferony (IFN)	23
2.7	Chemokiny jako významné biomarkery rejekce	26
2.7.1	CXCL10	27
2.7.2	CXCL9	28
2.7.3	CCL17	28
2.8	CMV (cytomegalovirus) jako významný rizikový faktor rejekce	29
2.9	BKV jako významný rizikový faktor rejekce	30
2.10	Imunosupresiva	30

2.10.1	Indukční imunosuprese	30
2.10.2	Udržovací imunosuprese	31
2.10.3	Antirejekční terapie.....	32
3	Cíle práce.....	33
4	Experimentální část.....	34
4.1	Schéma pokusu	34
4.2	Přístroje a chemikálie.....	35
4.2.1	Přístroje	35
4.2.2	Chemikálie a materiál pro izolaci buněk (z periferní krve příjemců a ze sleziny dárce) a pro metodu IFN- γ ELISPOT.....	35
4.2.3	Chemikálie a materiál pro metodu ELISA (CXCL10, CXCL9, CCL17)	36
4.3	Metody.....	37
4.3.1	IFN- γ Enzyme-linked Immunosorbent spot assay (ELISPOT)	37
4.3.2	ELISA CXCL10/IP10, CXCL9/MIG, CCL17/TARC	41
4.3.3	BKV PCR	44
4.3.4	Statistické zpracování dat.....	44
5	Výsledky.....	45
5.1	Chemokiny v době tříměsíční protokolární biopsie s hraničními změnami (ELISA)	45
5.2	Chemokiny v době časné indikační biopsii s hraničními změnami (ELISA)	52
5.3	Výsledky IFN- γ ELISPOT	55
6	Diskuze	61
7	Závěr.....	68
8	Seznam obrázků a tabulek	69
9	Literatura	71

Seznam zkratek

ABMR	Antibody mediated rejection	Humorální rejekce
ACR	Acute rejection	Akutní rejekce
Ag	Antigen	Antigen
APC	Antigen presenting cell	Buňka prezentující antigen
ATG	Antithymocyte globuline	Antithymocytární globulin
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintrifosforečná kyselina
BKV	BK virus	Nefropatický BK virus
CDC	Complement dependent cytotoxicity assay	Komplement dependentní cytotoxický test
CMV	Cytomegalovirus	Cytomegalovirus
CTL	Cytotoxic T lymphocyte cytotoxicity assay	Cytotoxický T lymfocyt cytotoxický test
DAMP	Danger associated molecular patterns	Endogenní nebezpečné vzory
DC	Dendritic cell	Dendritická buňka
DGF	Delayed graft function	Opožděná funkce štěpu
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
DSA	Donor specific antibodies	Donor-specifické protilátky
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	
ELISPOT	Enzyme-linked immunosorbent spot assay	
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	Průtoková cytometrie
FasL	Fas ligand	Fas ligand
FCS	Fetal calf serum	Fetální telecí sérum
HLA (I/II)	Human leukocyte antigen (class I/II)	Lidské leukocytární antigeny (I./II.)
IE-1	Immediate early protein-1	Bezprostředně časný protein-1
IFN- α	Interferon alpha	
IFN- γ	Interferon gamma	Interferon gamma
Ig	Immunoglobulin	Imunoglobulin
IKEM	Institute for Clinical and Experimental Medicine	Institut klinické a experimentální medicíny
IL	Interleukin	Interleukin

MFF	Mycophenolate mofetil	Mykofenolát mofetil
MHC	Major histocompatibility complex	Hlavní histokompatibilní komplex
NK	Natural killer cell	Přírozený zabíječ
PAMP	Pathogen associated molecular patterns	S patogeny asociované molekulární vzory
PBMC	Periferal blood mononuclear cell	Mononukleární buňky v periferní krvi
PBS	Phosphate buffered saline	Fosfátový pufr
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
pp65	Phosphoprotein 65	Phosphoprotein 65
PRA	Panel reactive antibodies	Panel-reaktivní protilátky
PRR	Pattern recognition receptor	Receptory rozeznávající molekulové vzory
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts	
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
RT	Room temperature	Pokojová teplota
TCMR	T cell mediated rejection	T buňkami zprostředkovaná
TCR	T cell receptor	T buněčný receptor
TGFβ	Transforming growth factor beta	Transformující růstový faktor beta
Th	Helper T lymphocyte	Pomocný T lymfocyt
TLR	Toll like receptor	
TNFα/β	Tumour necrosis factor	Faktor nekrotizující nádory
Treg	Regulatory T lymphocyte	Regulační T lymfocyt

1 Úvod

Transplantace ledviny představuje pro pacienty s nevratným selháním ledvin nejlepší možnost léčby. Imunitní reakce příjemce ledviny namířená proti štěpu dárce je tlumena imunosupresivní léčbou. Při použití moderní imunosuprese se jedná o výborné výsledky jednoročních přežívajících štěpů (až z 93 %), u pacientů (z 95 %). Pětileté výsledky tak úspěšné nejsou (jedná se pouze o 66 % přežití štěpů, 79 % pacientů) (Viklický et al. 2008, Shahbazi et al. 2015, Hart et al. 2018). K faktorům, ovlivňující fungování transplantované ledviny, patří celkový stav pacienta před transplantací (doba na dialýze, přidružené komorbidity), kvalita dárcovské ledviny (ischemicko-reperfúzní poškození, délka studené ischémie) a imunitní faktory (neshoda v HLA a non-HLA antigenech, přítomnost rejekcí, reaktivace virových infekcí) (Moreso a Hernández 2013).

U zhruba 15 % příjemců ledvin se do 3. měsíce vyskytuje akutní rejekce (ACR) (Viklický et al. 2008). Pokud jsou změny v biopsii mírnějšího rázu a nesplňují kritéria akutní rejekce, lze je v Banffské klasifikaci zařadit do kategorie hraniční změny (Grimbert et al. 2007). Přítomnost hraničních změn v biopsii představuje riziko rozvoje následné akutní rejekce (Viklický et al. 2008).

Cílem této práce bylo pokusit se najít biomarkery, které by pomohly identifikovat pacienty s hraničními změnami, kteří mají vyšší riziko rozvoje následné rejekce. Pomocí metody ELISA jsem měřila hladinu prozánětlivých chemokinů CXCL9, CXCL10 a CCL17 v moči/séru pacientů a stanovovala jsem frekvence buněk produkujících prozánětlivý cytokin IFN- γ po stimulaci buňkami dárce či virovými peptidy ELISPOTem.

2 Literární přehled

2.1 *HLA systém*

HLA (human leukocyte antigen) antigeny jsou povrchové glykoproteiny, umístěné na vnější membráně buněk člověka. HLA molekuly jsou zodpovědné za prezentaci antigenu TCR receptoru na T lymfocyту. Díky HLA molekulám dochází k rozpoznání vlastních a cizích antigenů (Horton et al. 2004).

HLA antigeny jsou kódovány rozsáhlým genovým komplexem z oblasti p21- 31 na krátkém raménku 6. chromosomu (více než 3500 kb). Tato oblast je vysoce polymorfní, což zajišťuje velkou míru obranyschopnosti populace proti patogenům. Vysoký polymorfismus je však překážkou při transplantacích orgánů (Horton et al. 2004). Téměř všechny transplantace kadaverózních ledvin jsou prováděny od nepříbuzných jedinců. V patofyziologii odmítnutí štěpu hraje zásadní roli počet neshod v HLA. U všech dárců i příjemců se vždy stanovují HLA antigeny A, B a DR. V poslední době se často stanovují i další skupiny (C a DQ) (Viklický et al. 2008).

2.1.1 *HLA antigeny I. třídy*

Antigeny HLA I. třídy jsou v různé míře exprimovány na povrchu všech jaderných buněk člověka. Dělí se na klasické HLA A, B, C a neklasické E, F, G (Horton et al. 2004). Skládají se z jednoho transmembránového těžkého řetězce α a jednoho lehkého řetězce β_2 mikroglobulinu (β_2m). α řetězec má tři extracelulární domény ($\alpha 1-3$) a je nekovalentně asociován s lehkým řetězcem β_2 (β_2m) (tento řetězec je kódován z chromozomu 15). HLA antigeny I. třídy mají imunoglobulinovou terciární strukturu (Li a Raghavan 2010) (obr. 1).

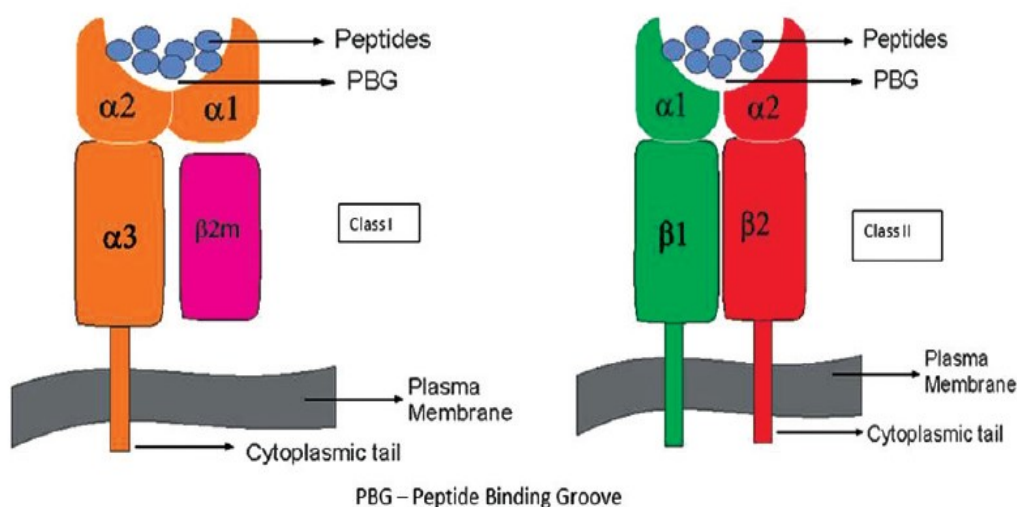
Molekuly HLA I. třídy váží krátké peptidy (o 8 - 10 aminokyselinách) endogenního původu. Tyto peptidy pocházejí z intracelulárních, buňce vlastních proteinů, mohou také pocházet i z intracelulárních virů. Vazebné místo pro peptidy je u HLA I. na obou koncích uzavřené. Komplexy HLA I. s navázaným peptidem jsou rozpoznávány CD8⁺ T lymfocyty (cytotoxickými T lymfocyty). HLA proteiny také interagují s inhibičními receptory (KIR) exprimovanými na povrchu NK buňky (z angl. natural killer cell, „přirozený zabiják“), to často vede k inhibici NK buněčné aktivity (Li a Raghavan 2010).

2.1.2 HLA antigeny II. třídy

HLA antigeny II. třídy se nevyskytují na všech buňkách člověka. Jsou přítomny na antigen prezentujících buňkách (APC), na dendritických buňkách (DC), B lymfocytech a na makrofázích. Exprese HLA II. může být také indukována interferonem- γ na endotelových buňkách, některých epiteliálních buňkách a tubulárních buňkách. K antigenům HLA II. třídy patří DR, DQ, DP a jsou tvořeny 2 těžkými řetězci α a β . Strukturně se jedná o heterodimery. Alfa řetězec obsahuje dvě domény $\alpha 1$ a $\alpha 2$. Beta polypeptidový řetězec obsahuje také dvě domény, $\beta 1$ a $\beta 2$. Oblasti $\alpha 1$ a $\beta 1$ řetězců formují membránové peptidové domény, zatímco oblasti $\alpha 2$ a $\beta 2$ tvoří membránově imunoglobulinovou doménu (Jones et al. 2006) (obr. 1).

Molekuly HLA II. třídy vážou dlouhé peptidy, exogenního původu o 15 – 35 aminokyselinách. HLA antigeny II. třídy jsou také vysoce polymorfní (Jones et al. 2006).

Komplexy HLA II. s navázanými peptidy interagují s receptory CD4⁺ T lymfocytů (pomocné T lymfocyty) a uplatňují se při zprostředkování humorálních imunitních odpovědí (Jones et al. 2006).



Obr. 1: Struktura molekul HLA 1. a 2. třídy. Převzato z: http://www.gjtmonline.com/viewimage.asp?img=GlobJTransfusMed_2017_2_2_77_214287_f1.jpg.

2.1.3 *Anti-HLA protilátky*

Anti-HLA protilátky hrají důležitou roli při rejekci štěpu. Pozitivita anti-HLA protilátek není vždy spojena s nižším přežitím štěpu. Některé studie naznačují, že pozitivita anti-HLA protilátek představuje střední riziko ztráty štěpu a rejekce zprostředkované protilátkami, a že tito pacienti tedy vyžadují zesílenou imunosupresivní léčbu (Richter et al. 2016, Malheiro et al. 2017). Ale u sensitizovaných pacientů mohou být dlouhodobě rizikovým ukazatelem ztráty štěpu (Michielsen et al. 2018). Anti-HLA protilátky se vyvíjejí v těhotenství, krevními transfuzemi nebo transplantacemi orgánů (Heidt et al. 2018).

2.2 *Vyšetřovací metody stanovení imunologického rizika před transplantací*

Imunitní stav pacientů je rutinně monitorován před i po transplantaci řadou metod jako stanovením hladiny panel reaktivních protilátek (PRA) pomocí metodiky Luminex, cytotoxickým cross-match testem a hodnocením T a B crossmatch pomocí průtokové cytometrie. Kromě toho byla v posledních letech studována možnost predikce rozvoje rejekce pomocí metodiky ELISPOT (Enzyme-linked immunosorbent spot assay).

2.2.1 *Panel-reaktivní protilátky (PRA)*

Kvůli odhadu imunologického rizika se u pacientů na čekací listině provádí vyšetření frekvence panel reaktivních protilátek (PRA). PRA udává frekvenci protilátek v séru pacienta proti buněčnému panelu (50 – 100 buněk se známými HLA antigeny). Buněčný panel by měl odrážet zastoupení hlavních antigenů v dané populaci. Výsledek PRA je definován jako procento buněk v panelu, na které sérum reaguje. Tyto protilátky lze identifikovat pomocí klasického komplement-dependentního cytotoxického testu (CDC), případně metodou ELISA, luminexem či průtokovou cytometrií. Potenciální příjemci ledvin jsou rozděleni do různých rizikových skupin na základě procenta PRA positivity s různými úrovněmi cut-off, v závislosti na použité metodě. Obvykle pacienti s nízkým rizikem mají PRA v rozmezí 0 - 19 %, pacienti ve středním riziku 20 - 79 % a vysoce riziková pacienta mají PRA vyšší než 80 % (Barocci et al. 2007; Premasathian et al. 2008).

2.2.2 *Crossmatch*

V den transplantace se provádí komplement-dependentní mikrolymfocytotoxický test (CDC) pro určení přítomnosti protilátek proti neshodným antigenům dárce orgánů. Přítomnost IgG protilátek proti neshodným (většinou HLA) antigenům dárce je kontraindikací pro transplantaci ledviny. Sérum příjemce je přidáno k dárcovským lymfocytům (T nebo B) v přítomnosti komplementu. Negativní test je, když dárcovsky specifické anti-HLA protilátky nejsou přítomné a nedojde k aktivaci komplementu. Pozitivní test nastane, když dárcovsky specifické protilátky váží lymfocyty, aktivují komplement a způsobují buněčnou lýzu. Pro odhad rizika rejekce u sensitizovaných příjemců se provádí FACS crossmatch pomocí průtokové cytometrie. Sérum příjemce je přidáno k dárcovským lymfocytům (T nebo B) v přítomnosti anti-IgG fluorescenčně značených protilátek. Vyhodnocování je obdobné jako u předchozí varianty s tím rozdílem, že v případě pozitivního testu dárcovsky specifické protilátky váží lymfocyty, které jsou detekovány průtokovou cytometrií jakmile anti-IgG fluoresceinem značené protilátky váží lymfocyty (Kumar et al. 2017).

2.2.3 *Donor specifické protilátky (DSA)*

Anti-HLA protilátky specifické pro dárce (DSA) způsobují rejekci zprostředkovanou protilátkami, následně ztrátu štěpu a nutnost další transplantace (Loupy et al. 2013, Michielsen et al. 2018). Přítomnost předtransplantačních DSA je rizikovým markerem ztráty funkce štěpu (Hart et al. 2018, Louis et al. 2019). DSA se naváží na HLA přítomné na endotelu transplantované ledviny, kde mohou aktivovat komplement, což má za následek infiltraci štěpu leukocyty, tvorbu trombů a endoteliální buněčnou lýzu. Endoteliální buňky také mohou v reakci na vazbu DSA zvýšit množství prozánětlivých molekul, což vede k poškození endotelu (Loupy et al. 2013). U presensibilizovaných pacientů byla přítomnost DSA v době transplantace identifikována jako vysoce rizikový faktor pro akutní humorální rejekci a pacienti, u nichž se vyvinula anti-HLA DSA, mají nižší tendenci k dlouhodobému přežití štěpu (Lefaucheur et al. 2010).

Po virové infekci nebo vakcinaci mohou mít protilátky schopnost zkřížené reakce s HLA. Tato takzvaná heterologní imunita je způsobená alloreaktivitou T lymfocytů nebo bystander aktivací paměťových B lymfocytů specifických pro HLA (Heidt et al. 2018).

Pro detekci anti-HLA protilátek se využívá metoda Luminex, je údajně citlivější a specifitější než CDC. Metoda Luminex představuje test na pevné fázi, ve kterém jsou purifikované molekuly HLA (buď jediného typu HLA nebo kombinace typů) připojeny k fluorescenčně značeným mikrokuličkám. Tyto molekuly se vážou na anti-HLA protilátky v pacientově séru. S využitím technologie jednoho antigenu může Luminex před transplantací predikovat sensibilizaci pacienta na konkrétní typy HLA (Worsley et al. 2011).

2.3 *Imunitní odpověď proti allotransplantátu*

Na rejekci transplantovaného orgánu se podílí přirozená imunitní odpověď, která převládá na počátku imunitní odpovědi a adaptivní imunitní odpověď, která nastoupí později a je výsledkem rozpoznávání alloantigenu hostitelskými T lymfocyty (Abbas a Lichtman 2003).

2.3.1 *Přirozená imunitní odpověď*

Přirozená imunitní odpověď na allotransplantát se vyvíjí brzy po transplantaci a je nezávislá na antigenu (He et al. 2003).

Infekční poškození při transplantaci aktivuje mechanismy přirozené imunitní odpovědi, vedoucí k uvolnění molekul, které se podílí na neinfekční zánětlivé odpovědi – DAMP (Danger associated molecular patterns) např. calgranulin A a B, amyloid A. Ty jsou rozpoznávány specifickými receptory (PRR Pattern recognition receptor). (Abbas a Lichtman 2003, Chong a Alegre 2012).

PRR receptory, PAMP (Pathogen associated molecular patterns), které se podílí na infekční zánětlivé odpovědi, hrají významnou roli v souvislosti s poškozením štěpu. Rozlišují se transmembránové a cytosolické PRR. Transmembránové PRR zahrnují TLR receptory (z angl. názvu Toll-like receptor), lektiny typu C, komplementové receptory, scavenger receptory a manózoové receptory. Mezi cytosolické PRR patří například receptory, indukovatelné kyselinou retinovou (Iwasaki a Medzhitov 2010). Aktivace PRR receptoru na povrchu dendritických buněk vede k jejich zranění, zvýší se exprese kostimulačních molekul a dojde k sekreci prozánětlivých cytokinů (Pratschke et al. 2009). Následně pak maturované APC migrují do sekundárních lymfoidních orgánů

a vyvolávají aktivaci alloreaktivních naivních T lymfocytů na efektorové T lymfocyty (Pratschke et al. 2009).

Tyto efektorové buňky migrují do štěpu, kde aktivují makrofágy a granulocyty. Tyto buňky prostoupily štěp v reakci na zánět. Granulocyty mohou vést k tvorbě lézí. (Pratschke et al. 2009, Castellano et al. 2010).

Komplement a jeho cesty aktivace (klasická, alternativní a lektinová) mohou být aktivovány v zánětlivém prostředí při poškození (Abbas a Lichtman 2003).

2.3.2 *Adaptivní imunitní odpověď a mechanismy rozpoznávání HLA antigenů*

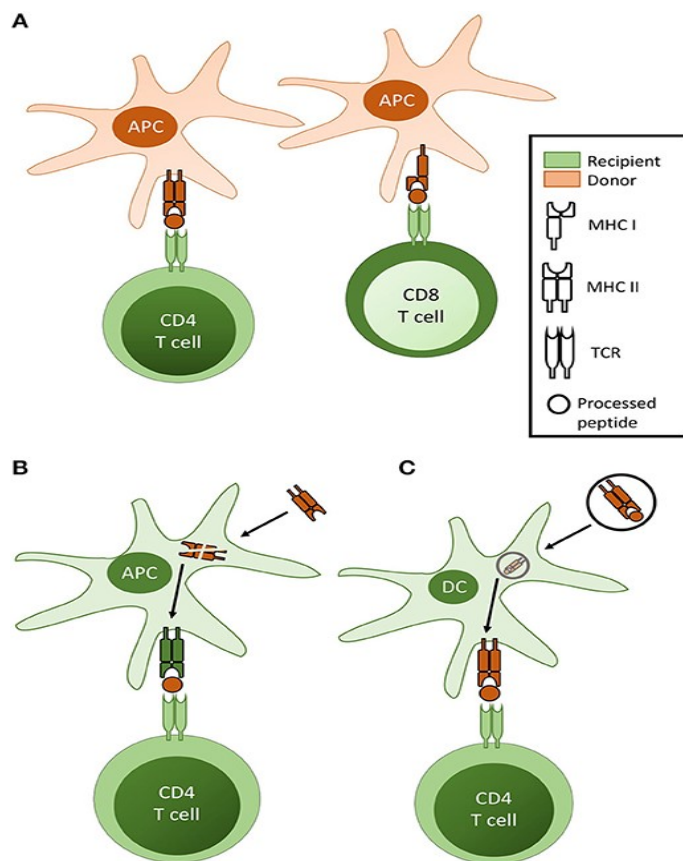
Adaptivní imunitní odpověď se objevuje později, je antigen specifická. Adaptivní imunitní odpověď je založena na prezentaci alloantigenů antigen prezentujícími buňkami (APC), nejúčinněji dendritickými buňkami (DC), (dále např. makrofágy) a jejich rozpoznáváním T lymfocyty příjemce (Abbas a Lichtman 2003).

T lymfocyty příjemce rozpoznávají HLA antigeny dárce přímým, nepřímým a polopřímým způsobem. Při přímém rozpoznání je alloantigen rozpoznán přímo na APC buňkách dárce štěpu. DC dárce fungují jako passenger leukocyty. V zánětlivém prostředí transplantované ledviny APC dárce zrají a s prozánětlivými cytokiny IL-1 β z rodiny interleukinů 1, TNF- α (tumor necrosis α), IL-6 migrují do sekundárních lymfoidních orgánů příjemce, kde jsou rozpoznány jeho T lymfocyty (Ochando et al. 2006) (obr. 2).

Při nepřímém rozpoznání dendritické buňky příjemce rozeznají a prezentují alloantigeny dárce jako peptidy na svých HLA molekulách (Siu et al. 2018). Dendritické buňky exprimují jak antigeny HLA I. třídy, tak HLA II. třídy. Dárcovské antigeny mohou být prezentovány buď Th lymfocytům (CD4+) vážící peptid v komplexu s HLA II. třídou, nebo cytotoxickým Tc lymfocytům (CD8+) vážící peptid v souvislosti s HLA I. třídou (Game a Lechler 2002). K aktivaci T lymfocytů, s receptory TCR dochází s kostimulačními molekulami (CD28/CD80, CD28/CD86, CD40/CD40L) (Game a Lechler 2002) (obr. 2).

Třetí, polopřímý způsob rozpoznání antigenu, je založen na schopnosti buněk předávat si intaktní alloantigen mezi sebou, a to buď přímým kontaktem (Russo et al. 2000), nebo fúzí s exosómy dárce (Marino et al. 2016). Tímto způsobem prezentuje dendritická buňka příjemce intaktní alloantigen dárce, který je pak rozpoznán CD4+ buňkami příjemce (Russo et al. 2000, Marino et al. 2016, Siu et al. 2018) (obr. 2).

Na časné akutní rejekci štěpu se podílí jak nepřímá, tak přímá allorekognice zprostředkovaná CD4⁺ T lymfocyty. Naproti tomu za chronickou rejekci je zodpovědná převážně nepřímá CD4⁺ T buněčná odpověď. Na chronické rejekci se může podílet do určité míry i polo-přímé rozpoznání (Siu et al. 2018) (obr. 2).



Obr. 2: Způsoby rozpoznávání alloantigenů u orgánových transplantací: (A) Přímé rozpoznání alloantigenů ve formě intaktního proteinu na povrchu dárcovské APC pomocí CD4⁺ a CD8⁺ T buněk příjemce. (B) Nepřímé rozpoznání, alloantigen je pohlčen APC příjemce (většinou dendritickou buňkou), zpracován a prezentován ve formě peptidového fragmentu v kontextu HLA příjemce a rozpoznán CD4⁺ T buňkami příjemce. (C) Polopřímé rozpoznání, alloantigen je prezentován DC příjemce ale v intaktní formě. Převzato z: Siu, J.H.Y., Surendrakumar, V., Richards, J.A., Pettigrew, G.J. (2018): T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. Front. Immunol. 9: 2548.

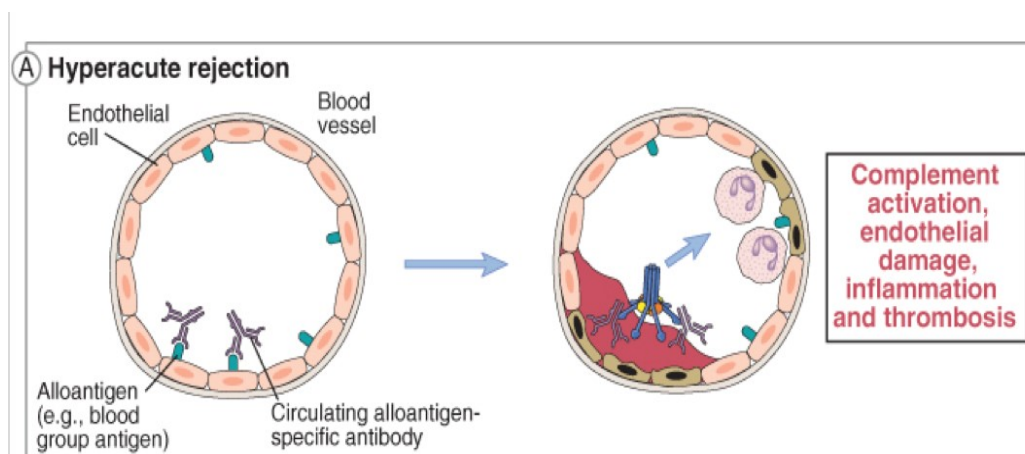
2.4 Rejekce štěpu

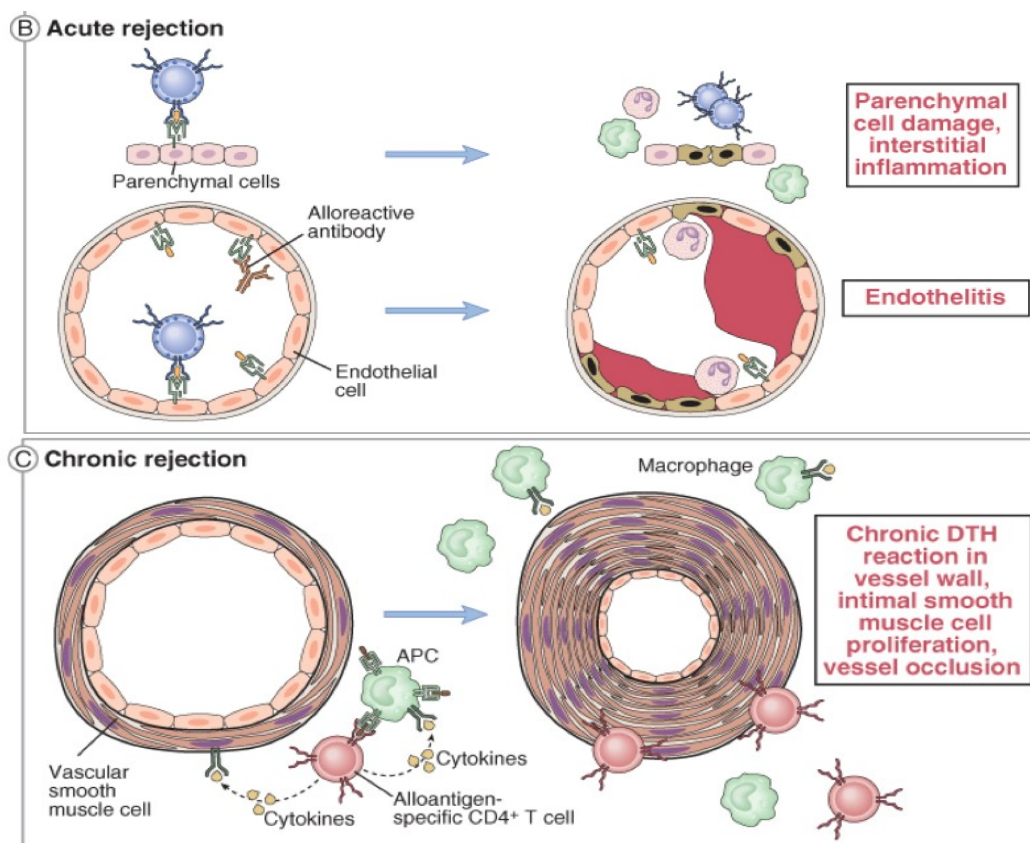
Rejekce (odhojení) štěpů ledviny lze rozdělit podle doby vzniku od transplantace (hyperakutní, akutní a chronické) a podle typu imunitní odpovědi (buněčná a humorální).

Hyperakutní rejekce se objevuje v prvních minutách po transplantaci a je způsobena přítomností preexistujících dárcovsky-specifických protilátek u příjemce. Tyto protilátky způsobují aktivaci komplementu a adhezi krevních destiček, dojde k vytvoření trombózy, poté ke ztrátě štěpu (Abbas a Lichtman 2003) (obr. 3). V současnosti se hyperakutní rejekce téměř nevyskytuje, protože u všech pacientů se před transplantací provádí lymfocytotoxický cross-match (CDC; inkubace pacientova séra s lymfocyty dárce) a v případě jeho positivity je transplantace kontraindikována (Patel a Terasaki 1969).

Akutní rejekce se objevuje mezi prvním týdnem a několika měsíci po transplantaci. Je charakterizována infiltrací štěpu makrofágy a lymfocyty a poměrně dobře reaguje na léčbu. Akutní rejekce se rozlišuje na akutní T buňkami zprostředkovanou rejekci a akutní humorální rejekci, vyvolanou B lymfocyty (Abbas a Lichtman 2003) (obr. 3).

Chronická rejekce je z dlouhodobého hlediska hlavní příčinou selhání štěpu. Špatně reaguje na léčbu imunosupresivy a je zprostředkována humorálními nebo buněčnými mechanismy (Abbas a Lichtman 2003) (obr. 3).





Obr. 3: Hyperakutní, akutní a chronická rejekce. Převzato z: <https://www.memorangapp.com/flashcards/106767/Week+9++Transplant+immunology/>.

2.4.1 Akutní rejekce – zprostředkovaná T lymfocyty (TCMR)

T lymfocyty příjemce rozpoznávají HLA antigeny dárce na endotelu štěpu. Po aktivaci naivních CD4⁺ (Th lymfocytů) pomocí APC dochází k jejich diferenciaci na Th1, Th2, Th17 lymfocyty a Treg. V prozánětlivém prostředí se objevují zejména Th1 a Th17 lymfocyty (Abbas a Lichtman 2003). Th1 lymfocyty produkují IFN- γ a IL-2 a tyto cytokiny při akutní rejekci migrují do štěpu (Yuan et al. 2009). IL-17 produkovaný buňkami Th17, stimuluje produkci zánětlivých cytokinů a chemokinů, to vede k proniknutí neutrofilů a makrofágů do štěpu (Abbas a Lichtman 2003).

CD8⁺ T lymfocyty se také dostávají do štěpu a mohou se diferencovat na CTL (cytotoxické lymfocyty) (Abbas a Lichtman 2003). Cytotoxické lymfocyty zabíjí jiné buňky pomocí perforinu a granzymu B nebo cestou Fas a FasL. Tyto dvě dráhy vyvolávají apoptózu cílových buněk (Celli et al. 2011). CTL jsou také schopné vylučovat rozpustné mediátory jako např. TNF- α a šíří se do celého štěpu, kde poškozují tkáň (Celli et al. 2011).

Při akutní rejekci hrají úlohu i paměťové T lymfocyty, centrální a efektorové. Centrální a efektorové paměťové T lymfocyty jsou CD45RO⁺ CD45RA⁻, liší se svou expresí markerů CD62L / CCR7 (Barber et al. 2003). Efektorové paměťové

T lymfocyty exprimují vysoké hladiny receptorů CCR1, CCR3 a CCR5 a centrální paměťové T lymfocyty exprimují CCR4 a CCR6 (Barber et al. 2003, Wang et al. 2006). Alloreaktivní paměťové T lymfocyty, vytvořené předchozí sensibilizací dárcovského antigenu při transplantaci, mohou vést k akutní rejekci a k rozvoji chronického poškození štěpu. Tyto buňky lze detekovat metodou IFN- γ ELISPOT. Bylo prokázáno, že frekvence paměťových T lymfocytů reaktivních vůči dárce v periferní krvi pacientů před transplantací ledvin koreluje s rizikem vzniku akutní rejekce a se špatnou funkcí alloštěpu ledvin po 1 roce (Heeger et al. 1999, Augustine et al. 2005, Crespo et al. 2015). Detekce buněk paměťového fenotypu (CD45RO+) v biopsiích a periferní krvi pacientů koreluje se závažností rejekce ledvinného štěpu (Azzawi et al. 1998).

2.4.2 Akutní rejekce – protilátkově zprostředkovaná rejekce (ABMR)

Akutní humorální rejekce se účastní B lymfocyty, které prezentují antigen a produkují protilátky. B lymfocyty se mohou podílet na odmítnutí alloštěpu různými mechanismy. B lymfocyty mají schopnost podporovat aktivaci a diferenciaci T lymfocytů s uvolňováním cytokinů (Constant 1999). B lymfocyty podporují alloreaktivní diferenciaci T lymfocytů na paměťové T lymfocyty. Nedostatečná prezentace antigenu B lymfocytům může ovlivnit přežití štěpu (Noorchashm et al. 2006).

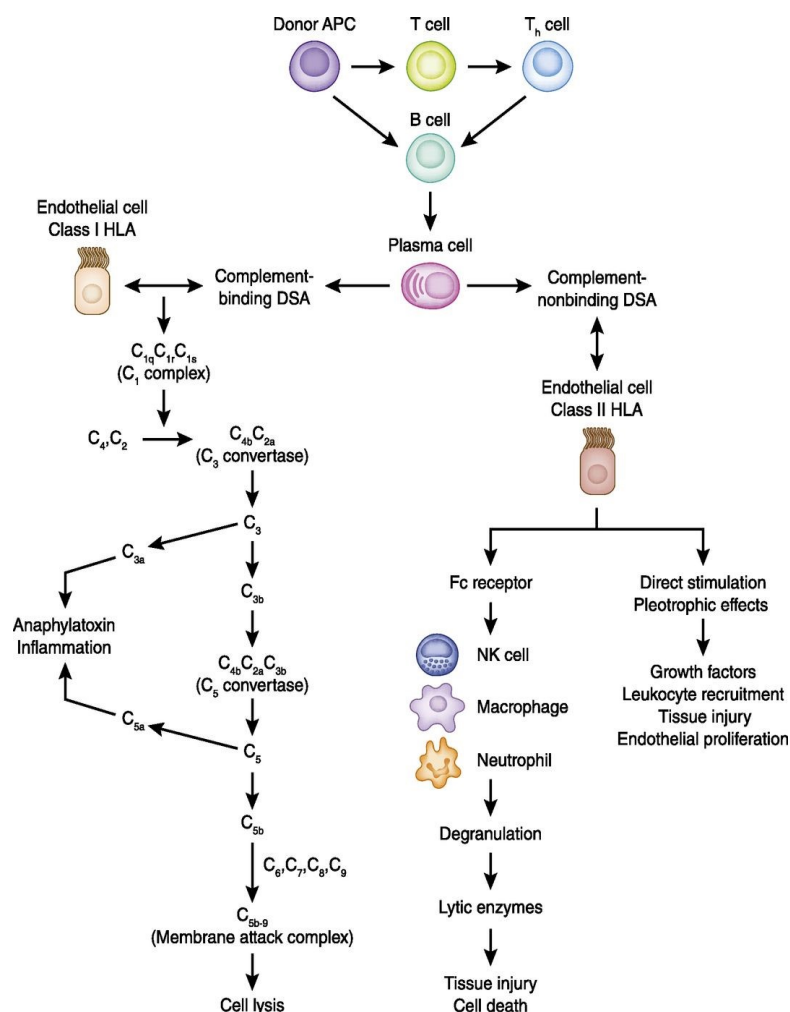
Indukovaná alloimunitní odpověď, zprostředkovaná anti-HLA protilátkami, je hlavním faktorem ztráty alloštěpu ledvin (orgánový transplantát mezi dvěma geneticky rozdílnými jedinci téhož druhu). Tyto protilátky, vyvíjející se proti orgánu dárce, rozpoznávají různé typy antigenů HLA antigeny I. a II. třídy, MICA a MICB antigeny (neklasické molekuly MHC I. třídy A a B) (Terasaki a Ozawa 2004, Montgomery et al. 2012, Sellares et al. 2012). Alloprotilátky vyvolávají akutní humorální rejekci mechanismy závislými na komplementu, a to zejména komplexem C1. C1q je složkou komplexu C1, která je spojena s vyšším výskytem akutní humorální rejekce (Cosio et al. 2010).

2.4.3 *Chronická rejekce – protilátkově zprostředkovaná rejekce*

Hlavní příčinou ztráty ledvinného štěpu je chronická rejekce (47 %), pouze 6,2 % selhání štěpu je způsobeno akutní rejekcí. Chronická protilátkově zprostředkovaná rejekce (ABMR antibody mediated rejection) se často projevuje až několik let po transplantaci (Hart et al. 2016). Chronická ABMR spočívá v produkci DSA (donor specifické protilátky), toto onemocnění se projevuje při pozitivitě C4d a zhoršováním renální funkce související s vyšší expresí endotelových genů (Sis et al. 2009, Wiebe et al. 2012). Pacienti, kteří v prvním roce po transplantaci měli biopsii C4d+, měli v dalších letech častěji transplantační glomerulopatie (TG) a rejekce (Regele et al. 2002).

Anti-HLA protilátky vyvolávají chronickou rejekci pomocí Fc receptoru nebo komplementovou kaskádou a aktivují endoteliální buňky. Funkce protilátek není však omezena pouze na aktivaci komplementu. Protilátky se mohou také vázat na NK, makrofágy a neutrofilů (Rebellato et al. 2006). NK buňky spolu s DSA při chronické rejekci spouštějí vaskulopatii (onemocnění cévních stěn, jedná se o vaskulární nádory jako např. hemangiomy, angiosarkomy). NK buňky způsobují endoteliální poškození cestou buněčné cytotoxicity (Hidalgo et al. 2010, Hirohashi et al. 2012). Endoteliální buňky s anti-HLA protilátkami se aktivují vlivem růstových faktorů, růstové faktory aktivují buňky do rejekce štěpu (Rossini et al. 2005). S růstovými faktory se zvyšuje adheze destiček během aktivace endoteliálních buněk (Yang et al. 2005). Dochází k proniknutí prozánětlivých buněk, aktivaci komplementu a koagulační aktivaci (Kennard et al. 2008) (obr. 4).

U chronické rejekce dochází k diferenciaci myofibroblastových buněk, které zapojují extracelulární matrix do chronické rejekce. Myofibroblastické buňky pronikají do stěny cév a jsou schopné diferenciaci na endoteliální buňky (Li et al. 2007).



Obr. 4: Anti-HLA protilátky vyvolávají chronickou rejekci pomocí Fc receptoru nebo komplementovou kaskádou a aktivují endoteliální buňky. NK buňky, makrofágy a neutrofilové vedou k degranulaci a mohou způsobit až nenávratné tkáňové poškození ve štěpu. Převzato z: <https://cjasn.asnjournals.org/content/13/1/182.figures-only>.

2.4.4 Chronická rejekce – zprostředkovaná T lymfocyty

Chronická TCMR se označuje jako chronická transplantační arteriopatie alloštěpu. Tato léze se vyznačuje rozšířením vnitřní výstelky cévy de novo akumulací kolagenu a zánětem zprostředkovaným mononukleárními buňkami (Katsuma et al. 2017).

Vevnitř cévy jsou myofibroblasty, seskupené mononukleární zánětlivé buňky (Katsuma et al. 2017). K chronické rejekci dochází poté, co jsou DC dárce nahrazeny DC příjemce v alloštěpu tedy nepřímou cestou. T lymfocyty, které reagují na komplexy allopeptid / MHC na APC příjemce, vstupují do štěpu a mohou způsobit bystander poškození štěpu produkcí cytokinů (Katsuma et al. 2017).

2.5 *Banffská klasifikace*

Histologická diagnostika rejekčních změn ledvinných štěpů vychází z Banffské klasifikace. Banffskou klasifikaci (Tab. 1) založili Kim Solez a Lorraine C. Racusen v kanadském Banffu v roce 1991 (2 roky poté byla klasifikace publikována) (Solez et al. 1993) a je dle nejnovějších poznatků aktualizována každé dva roky, s poslední verzí z roku 2017 (Loupy et al. 2017).

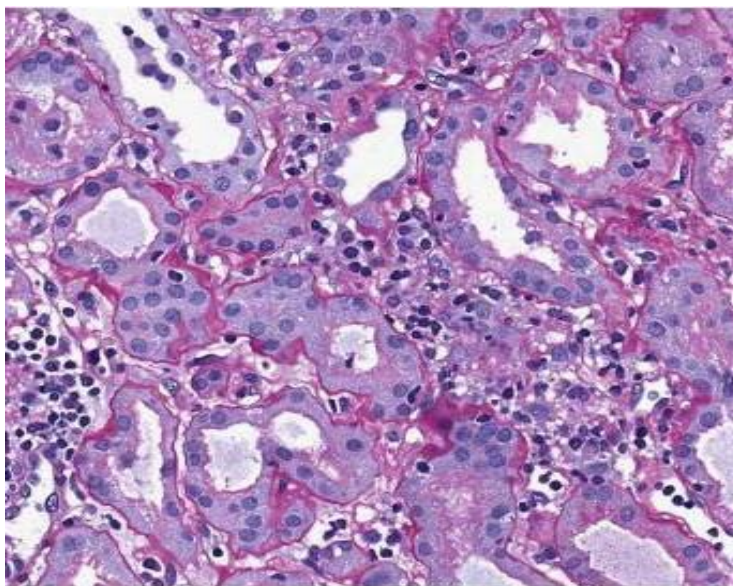
V současné době je v Banffské klasifikaci (Tab. 1) rejekce rozdělena do dvou hlavních kategorií: rejekce zprostředkovaná T lymfocyty (TCMR), která má podkategorie 4a (akutní TCMR) a 4b (chronická TCMR) a rejekce zprostředkovaná protilátkami (ABMR), 2a (akutní ABMR); 2b (chronická ABMR). Akutní TCMR (kategorie Banff 4) se dělí na typy I – III v závislosti na závažnosti intersticiálního zánětu, tubulitidy a arteritidy, které jsou hodnoceny jako 0 (nepřítomné nebo zanedbatelné), 1 (mírné), 2 (střední) nebo 3 (závažné). Existuje také další kategorie 3, zvaná Banff Borderline – hraniční změny, které nedosahují Banff I. typu akutní TCMR. Incidence je 11 % až 23 % (Matoza et al. 2008).

Tab. 1: Banffská klasifikace dysfunkce transplantované ledviny (z roku 2015). Zkratky: intersticiu (i), tubuly (t), cévy (v) a glomeruly (g). Převzato a upraveno podle: Loupy, A., Haas, M., Solez, K. et al. (2017): The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. American Journal of Transplantation. 17(1), 28-41.

1. Normální nález
2. Protilátkami zprostředkovaná rejekce
2 a. Akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce i. ATN podobná, C4d +, minimální zánět ii. Marginace kapilár anebo trombózy, C4d+ iii. Arteriální v3, C4d +, (transmurální nekrózou stěny)
2 b. Chronická aktivní rejekce zprostředkovaná protilátkami, průkaz C4d, dvojkontury GBM
3. Hraniční změny
4. Rejekce zprostředkovaná T lymfocyty
4 a. Akutní rejekce zprostředkovaná T lymfocyty i. Typ IA (> 25 % infiltrátu v intersticiu a střední tubulitida – t2) ii. Typ IB (> 25 % infiltrátu v intersticiu a těžká tubulitida – t3) iii. Typ IIA (lehká až střední intimální arteriitida – v1) iv. Typ IIB (těžká arteritida > 25 % lumina cévy) v. Typ III (transmurální arteritida, nekrózy, infiltrace arterií lymfocyty)
4 b. Chronická aktivní rejekce zprostředk. T lymfocyty „chronická alograft arteriopatie“
5. Intersticiální fibróza a tubulární atrofie
5 a. Mírná (\leq 25 % kortikální oblasti)
5 b. Střední (26–50 % kortikální oblasti)
5 c. Těžká (> 50 % kortikální oblasti)
6. Nerejekční změny BK virus nefropatie, akutní tubulární zánět...

2.5.1 *Hraniční změny*

V patologii renálních štěpů jsou hraniční změny (BL) definovány jako intersticiální zánět s tubulitidou, které svým rozsahem nesplňují diagnostická kritéria pro T buňkami zprostředkovanou rejekci (obr. 5). Výskyt hraničních změn u renálních štěpů je přibližně 20 % (Matoza et al. 2008). Většina transplantačních center léčí pacienty s hraničními změnami steroidy nebo navýšením udržovací imunosuprese (Meehan et al. 1999). Nicméně je otázkou, zda opravdu všichni pacienti s hraničními změnami potřebují léčbu. Některé studie naznačují, že BL jsou benigní, pokud se vyskytují u pacientů se stabilní funkcí štěpu (Gloor et al. 2002). Jiné studie naznačují, že přetrvávání infiltrátů BL může negativně ovlivnit přežití štěpu (Rush et al. 1995). Některá studie naznačují, že přibližně 30 % pacientů s BL nereaguje na antirejekční terapii. (Schweitzer et al. 1996) (obr. 5).



Obr. 5: Hraniční změny jsou charakterizovány infiltrací mononukleárních buněk (< 25 % parenchymu) nebo ložisek mírné tubulitidy (1 - 4 mononukleárních buněk / tubulární průřez) (barvení PAS, histologický obrázek z mikroskopie). Převzato z: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/kidneybanff.html>.

2.6 *Cytokiny jako významné biomarkery rejekce*

Cytokiny jsou nestrukturální proteiny, produkované imunitními i neimunitními buňkami po jejich aktivaci. Jedna buňka je schopna produkovat víc druhů cytokinů. Patří k nim interleukiny, chemokiny, interferony a nádorové nekrotické faktory. Cytokiny mají řadu pleiotropních účinků v různých orgánech. V kontextu transplantací orgánů hrají mimo jiné významnou roli prozánětlivé (TNF, IL-1, IL-6, IL-17 a IFN- γ) a protizánětlivé (regulační) cytokiny (IL-10, TGF- β a IL-35) (Stříž a Holář 2015). Dále cytokiny můžeme rozdělit podle typu buněk, které je produkují. Th1 cytokiny (IL-1, IL-2, IL-12, TNF- α a IFN- γ) a Th2 cytokiny (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) (Stříž a Holář 2015).

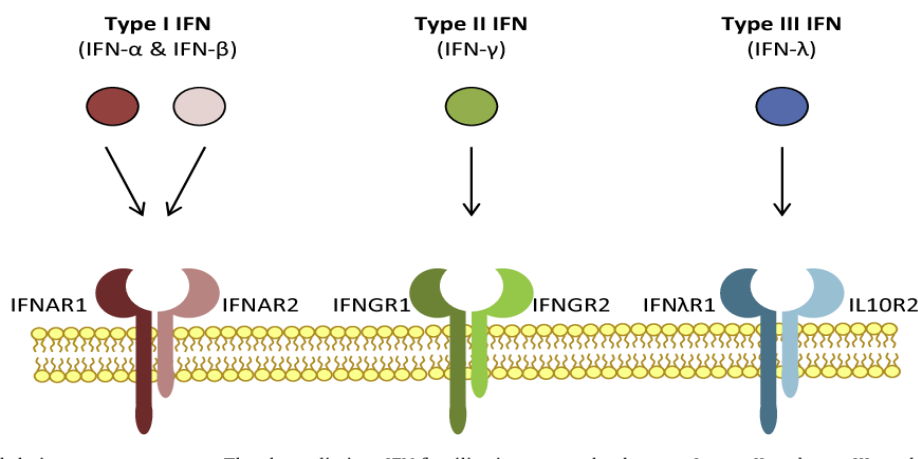
Th1 cytokiny se uplatňují při buňkami zprostředkovaných reakcích, stimulují aktivaci a diferenciaci B lymfocytů. Th1-cytokiny IL-2 a IFN- γ hrají významnou roli v imunitní odpovědi proti štěpu, důkazem byla přítomnost regulační molekuly Tim-3 (imunitní checkpoint receptor, který vyvolává inhibici Th1 odpovědi, důležitý pro expresi cytokinu IFN- γ) v parenchymu rejekovaného štěpu ledviny. Tvorba IL-2 je spojená s aktivací allospecifických lymfocytů. Produkce IFN- γ , který je aktivován makrofágy, vyvolává expresi HLA antigenů II. třídy na buňkách parenchymu, tento mechanismus se uplatňuje v rejekcích (Ponciano et al. 2007).

Th2-cytokiny v transplantačních reakcích regulují hlavně protilátkovou odpověď. Th2-cytokiny mohou rejekci bránit (IL-10), některé se ale účastní odvržení štěpu (např. IL-4, IL-6), při kterém je štěp infiltrován eozinofilními leukocyty a žírnými buňkami (Nocera et al. 2004, Stříž a Holář 2015).

Th17 lymfocyty produkující IL-17 souvisejí s neutrofilním zánětem, při kterém může dojít k rejekci allotransplantátu (Afzali et al. 2007, Stříž a Holář 2015).

2.6.1 *Interferony (IFN)*

Jsou klíčovou složkou vrozené imunity a první linie obrany proti virové infekci. Existují 3 odlišné typy (I., II. a III. typ), které se rozlišují na základě struktury, příbuzných receptorů a biologických aktivit. IFN I. typu (α , β) jsou důležité v obraně proti virové infekci. Naopak IFN II. typu zprostředkovávají imunitní odpověď proti intracelulárním patogenům. IFN III. typu (složený ze 3 podtypů, IFN λ 1, IFN λ 2 a IFN λ 3 nebo IL-29, IL-28A a IL-28B) mají podobné účinky jako IFN I. typu (Robb a Hill 2012) (obr. 6).



Obr. 6: Typy interferonů (I, II, III. třídy) a jejich receptory. Převzato z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Chicken-interferons%2C-their-receptors-and-genes.-Goossens-Ward/376ed5766c9c827d3e5a9fb9671475840f4a1707/figure/0>.

IFN 1. typu

Produkce IFN I. typu je indukována po aktivaci TLR receptoru (Toll like receptor). Nejúčinnějšími producenty jsou plazmacytoidní dendritické buňky (DC), které exprimují TLR7 a TLR9, které rozpoznávají jednovláknovou RNA a CpG (Cytosin-fosfát-Guanin) (Ito et al. 2005). Po zapojení těchto receptorů je regulační dráha MyD88-IFN (IRF7) rozhodující pro produkci IFN I. typu s komplexy CpG a MyD88 / IRF7 v endozomálních váčcích, zodpovědná za schopnost plazmacytoidních DC indukovat vysoké hladiny interferonu I. typu (Honda et al. 2005). Receptor je složen ze 2 podjednotek, IFNAR1 a IFNAR2. Po signalizaci pomocí receptoru jsou následné reakce přenášeny prostřednictvím kináz-tyrosinkinázy 2 a JAK1, která rekrutuje STAT1 za vzniku heterodimerního komplexu STAT1-STAT2, který migruje do jádra (Decker et al. 2005).

Interferony jsou důležité ve vrozené, tak i adaptivní imunitní odpovědi. IFN I. typu souvisí s virovou infekcí, přičemž signalizace vede k antiproliferativní odpovědi ve spojení s up-regulací exprese MHC I. třídy. Během adaptivní imunitní odpovědi je signalizace IFN I. typu životně důležitá pro expanzi a diferenciaci cytotoxických T lymfocytů (CTL) (Kolumam et al. 2005).

IFN 2. typu

IFN- γ je jediný interferon II. typu. Je produkován APC, CD4 + Th1 lymfocyty, CD8 + T lymfocyty, NK buňkami, NKT buňkami a jeho produkce je stimulována IL-12 a IL-18 (Schroder et al. 2004).

Přenos signálu pro IFN- γ probíhá prostřednictvím IFN- γ R, který je exprimován u většiny typů buněk a skládá se ze 2 podjednotek, IFN- γ R1 a IFN- γ R2. IFN receptor II. typu interaguje s JAK1 a JAK2 po přeskupení receptorových podjednotek závislých na ligandu, což vede k fosforylaci STAT1. Homodimery STAT1 se přesouvají do jádra a zahajují transkripci (Platanias et al. 2005).

IFN- γ se podílí na vrozené i adaptivní imunitě. Během vrozené imunitní odpovědi je IFN- γ důležitý pro aktivaci makrofágů, aktivitu NK buněk a regulaci MHC II. třídy na povrchu makrofágů. Po zahájení adaptivní imunitní odpovědi IFN- γ reguluje diferenciaci a funkci Th1 a následně inhibuje diferenciaci Th2. Signalizace přímo na CD8⁺ T lymfocytech stimuluje vývoj a zvyšuje se během akutní virové infekce (Whitmire et al. 2005). Jeho jedinečná role spočívá v indukci exprese hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) v epiteliálních a endoteliálních buňkách při rejekci štěpu. Při akutní celulární rejekci je vlivem interferonu- γ indukována exprese DR antigenů (antigeny HLA II. třídy) na tubulárních buňkách ledvinového štěpu. Tedy v pozdějších obdobích může IFN- γ podporovat poškození štěpu, také může působit přímo na alloštěpy nezávisle na jeho účinku na imunitní systém (Raisanen-Sokolowski et al. 1998).

ELISPOT IFN- γ test (Enzyme Linked Immuno Spot Assays)

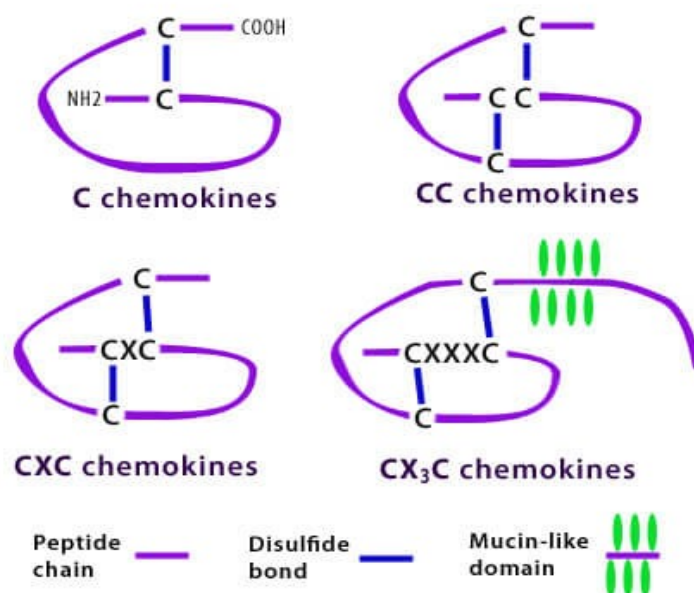
Měří frekvenci alloreaktivních paměťových/efektorových buněk příjemce, které po stimulaci buňkami dárce produkují IFN- γ (Ashoor et al. 2013). Ukázalo se, že předtransplantační frekvence dárcovsky reaktivních IFN- γ buněk (produkovaných z PBMC-mononukleární buňky z periferní krve) pomocí ELISPOT identifikuje pacienty se zvýšeným rizikem časně akutní buněčné rejekce (TCMR) a s horší funkcí štěpu (Crespo et al. 2015).

2.7 Chemokiny jako významné biomarkery rejekce

Chemokiny jsou chemotaktické cytokiny, které regulují imunitní systém a jsou významné v zánětlivém buněčném transportu. Název chemokin pochází z funkce chemotaxe (pohyb) pro leukocyty a jiné zánětlivé buňky (Abbas a Lichtman 2003).

Chemokiny jsou rozděleny na základě počtu a umístění N-terminálních cysteinových zbytků. Rozlišujeme: CC, CXC, CX₃C a C chemokiny (obr. 7). Chemokiny se váží na příslušné receptory, které jsou asociované s trimerními G proteiny na povrchu buněk se sedmi transmembránovými doménami (Abbas a Lichtman 2003). Chemokiny se účastní zánětlivých i homeostatických procesů. Zánětlivé chemokiny regulují přísun imunitních buněk do místa infekce. Homeostatické chemokiny regulují migraci buněk při fyziologických procesech a pomáhají vývoji tkání (Le et al. 2004).

V transplantačním prostředí působí chemokiny v těchto fázích: při infiltraci mononukleárních buněk na místo zánětu, v migraci APC do lymfatických uzlin, aktivaci nezralých T lymfocytů s APC v lymfatických uzlinách a migrací aktivovaných alloreaktivních T buněk do štěpu (Belperio a Ardehali 2008). Role některých prozánětlivých chemokinů při rejekci štěpu byla zkoumána, při jejich zvýšené hladině (např. u CXCL9, 10 atd.) dochází častěji k rejekci (Jackson et al. 2011).



Obr. 7: Struktury chemokinových tříd CC, CXC, CX₃C a C. Převzato z: <https://epomedicine.com/medical-students/chemokines-mnemonics/>.

Při počátečním stádiu zánětlivé reakce u transplantace ledvin dochází ke zvýšení produkce Th1 buněk, aktivují se T lymfocyty i NK buňky s cytokiny IL-1, IL-12, IL-18 a TNF- α . Zvýší se exprese chemokinových receptorů CCR5 (CCL5, CCL3 a CCL4) a CXCR3 (CXCL10, CXCL11 a CXCL9) (Lo et al. 2011). S cytokiny IL-4, IL-10 a IL-13 dochází k nárůstu produkce Th2 lymfocytů, také k expresi CCR3 (eotaxinový receptor v eosinofilech), CCR4 (receptor pro chemokin TARC neboli CCL17) (Cardoni et al. 2005).

Nejpokročilejšími biomarkery zánětu v moči pacientů po transplantaci ledvin jsou chemokiny CXCL9 a CXCL10, které mají společný receptor CXCR3 (Hu et al. 2004, Jackson et al. 2011, Lo et al. 2011). CXCL9 a CXCL10 jsou časnými markery dysfunkce ledvinového štěpu a zánětu ledvinového štěpu spojeného se subklinickou tubulitidou, akutní rejekcí (Schaub et al. 2009, Jackson et al. 2011).

Chemokiny CXCL9 a CXCL10 mohou lépe predikovat rejekci s lepší sensitivitou a specificitou testu než představuje zvýšená hladina koncentrace kreatininu v séru (Schaub et al. 2009, Jackson et al. 2011). U příjemců ledviny se prokázalo, že při nízké koncentraci chemokinů CXCL9 v moči (vzorky sbírané šest měsíců) mají pacienti malou pravděpodobnost vzniku akutní rejekce a zhoršení renální funkce v období od 6. do 24. měsíce. V prospektivní studii bylo zjištěno, že vysoké hladiny CXCL9 v moči předcházely klinickou akutní rejekcí o 15 dní u pacientů po transplantaci ledviny od žijících dárců (Hricik et al. 2015).

2.7.1 *CXCL10*

CXCL10 (dříve IP-10) chemokin, který je indukován IFN- γ a je produkován: monocyty, neutrofily, endoteliálními buňkami, keratinocyty, fibroblasty, mesenchymálními buňkami a dendritickými buňkami (Ge et al. 2012). Je regulován aktivací NF- κ B dráhy. Aktivace NF- κ B je zprostředkována proteinkinázou C (PKC) se zvýšeným intracelulárním vápenatým kationtem (Ca²⁺) (Han a Logsdon 1999). Působí jako antiangiogenní chemokin (Strieter et al. 1995).

CXCL10 je umístěn na chromozomu 4 a kóduje protein o 98 aminokyselinách. CXCL10 se svým receptorem CXCR3 je zásadní u zánětu, který vede k poškození tkání (Hassanshahi et al. 2008). CXCR3 má dvě různé izoformy: CXCR3-A a CXCR3-B. Osa CXCL10 / CXCR3-A přispívá k indukci chemotaxe a proliferace různých typů buněk, zatímco osa CXCL10 / CXCR3-B inhibuje migraci a proliferaci, ale indukuje apoptózu (Lasagni et al. 2003).

2.7.2 *CXCL9*

Chemokin CXCL9 je členem rodiny CXC a hraje důležitou roli v chemotaxi imunitních buněk. Je vylučován různými typy buněk, včetně imunitních např. T lymfocyty, NK buňky, dendritické buňky, makrofágy, eozinofily (Ikeda et al. 2014). CXCR3 (receptor spojený s G proteinem) se váže na chemokiny CXC např. CXCL9, CXCL10, CXCL11 a CXCL4 (Billottet et al. 2013). CXCR3 je vysoce exprimován na T buňkách, NK buňkách, a také je exprimován epiteliálními a endoteliálními buňkami atd. (Van Raemdonck et al. 2015).

Transkripční regulace CXCL9 je vícestupňový proces zahrnující aktivátor transkripce STAT1 a jaderný faktor NF- κ B (Chung et al. 2011). Na regulaci transkripce genu CXCL9 se také podílí myeloidní transkripční faktor PU.1 (Ellis et al. 2010). IFN- γ – indukovaná exprese CXCL9 a CXCR3 se podílí na akutní rejekci. Studie in vitro naznačila, že CXCL9 může ovlivnit proliferaci a vývoj T lymfocytů reaktivních na alloantigen v MLC (test Mixed lymphocyte reaction) (Whiting et al. 2004).

2.7.3 *CCL17*

Je známý také jako thymem aktivovaný a regulovaný chemokin (thymus and activation regulated chemokine) (TARC), produkovaný myeloidními dendritickými buňkami, endoteliálními buňkami a bronchiálními epiteliálními buňkami (Kumai et al. 2015). Je to ligand pro CC chemokinový receptor 4 (CCR4) a CC chemokinový receptor 8 (CCR8). Účastní se infiltrace cytotoxických T buněk (T_c) vazbou na CCR4 a aktivací CD8⁺ T lymfocytů prostřednictvím dendritických buněk, rekrutuje CCR4 + T lymfocyty na zanícená místa, čímž aktivuje imunitní odpověď typu Th2 (Henry et al. 2008). Exprese CCL17 je řízena množstvím prozánětlivých cytokinů IFN- γ , IL-1 a IL-4. Transkripční regulace genu je řízena faktory STAT6 a NF- κ B

(Wirnsberger et al. 2006). U rejekčních mechanismů dochází kvůli chemokinům – např. eotaxin (CCL17) nebo MDC (monocyte derived chemokine CCL22) k Th2 odpovědi a k infiltraci štěpu eozinofily (Viklický et al. 2008).

2.8 *CMV (cytomegalovirus) jako významný rizikový faktor rejekce*

Cytomegalovirus (CMV) je jedním z nejdůležitějších virů čeledi *Herpesviridae*, infikujících velké procento lidí na celém světě. Séroprevalence tohoto viru se liší v různých oblastech v rozmezí od 30 % do 97 % (Zhang et al. 1995). CMV onemocnění se projevuje většinou u jedinců s nedostatečnou funkcí imunitního systému nebo u imunosuprimovaných příjemců transplantátů (Bate et al. 2010).

U těchto pacientů je CMV onemocnění považováno za hlavní příčinu různých infekčních onemocnění a úmrtnosti. K infekci obvykle dochází během prvních 3 měsíců po transplantaci. Mezi rizikové faktory infekce cytomegalovirem patří např. věk pacienta, doba studené ischemie, genetické faktory spolu s celkovým imunitním stavem, který je určen imunosupresivními léky (druh léku, načasování). Jedním z nejvýznamnějších rizikových faktorů je sérologická nekompatibilita CMV mezi dárce transplantátu a příjemcem, zejména pokud je dárce pozitivní a příjemce negativní (Eid a Razonable 2010).

Po primární infekci CMV adaptivní imunitní reakce přetrvává po celý život a CMV- specifické CD4+, CD8+ T lymfocyty a specifický imunoglobulin G (IgG) se podílí na inhibici reaktivace viru (Crough a Khanna 2009). U CMV séropozitivního příjemce štěpu byly zaznamenány oportunní infekce a akutní nebo chronická rejekce (Couzi et al. 2015). Indukční depleční léčba jako například rATG (imunosupresivum – králičí antithymocytární globulin) může zvyšovat riziko infekce CMV ve srovnání s nedepleční indukční léčbou Basiliximabem (inhibitor IL2 receptoru) (Abou-Ayache et al. 2008). Metodou ELISPOT bylo zjištěno, že pretransplantační frekvencí CMV IE-1 buněk (Immediate–Early (IE) peptid) lze předpovědět riziko infekce CMV po transplantaci bez ohledu na sérostatus cytomegaloviru a typ imunosuprese (Bestard et al. 2013).

2.9 *BKV jako významný rizikový faktor rejekce*

BK virus (BKV) je řazen mezi lidské polyomaviry, je to neobalený virus o velikosti 45 nm. Tento virus je přítomný v krvi, tkáních genitálií, ale i v pokožce (Dolei et al. 2000). Po primární infekci se virus stává latentním, nejčastěji se nachází v urinárním epitelu (ledviny, močový měchýř apod.) (Dolei et al. 2000). V roce 1993 byla poprvé prokázána v biopsii transplantované ledviny BK virová nefropatie (BKVN). BKVN je významnou infekční komplikací, která se rozvíjí u 1 - 10 % pacientů po transplantaci ledviny. Toto onemocnění je asociováno se zvýšenou expresí IFN- γ , CXCR3 a perforinu (Park et al. 2006).

Mezi rizikové faktory rozvoje polyomavirové infekce patří vliv trojkombinanční udržovací imunosuprese, počet HLA neshod, anamnéza rejekcí, BKV séropozitivita dárce a příjemce, poškození štěpu (Manuel et al. 2013). BKV se v účincích podobá cytomegaloviru (CMV), oba viry se po infekci mohou dále reaktivovat po transplantaci ledviny (Park et al. 2006).

2.10 *Imunosupresiva*

Imunosupresivní terapii dělíme na indukční, udržovací a antirejekční.

2.10.1 *Indukční imunosuprese*

Indukční imunosuprese se podává pacientům v časném peri či potransplantačním období s cílem zabránit rejekci štěpu. V současné době se u transplantací ledvin používají dva typy indukční imunosuprese podle imunologického rizika pacientů. U pacientů v nízkém imunologickém riziku (první transplantace, žádné DSA protilátky, PRA < 20 %) se indikuje podání Basiliximabu (případně jsou bez indukční léčby) a u pacientů ve vysokém imunologickém riziku (přítomnost DSA, PRA > 20 %, retransplantace, marginální dárce) se indikuje podání Thymoglobulinu (Viklický et al. 2008, Gaber et al. 2012).

Imunosupresivum Basiliximab je monoklonální protilátka proti znaku CD25 (receptoru pro cytokin IL-2), která blokuje proliferaci T buněk. Basiliximab snižuje pravděpodobnost výskytu akutní rejekce do 6. měsíce po transplantaci. U tohoto imunosupresiva, dlouhodobé výsledky více než 12 měsíců po transplantaci, zůstávají podobné (Adu et al. 2003). V mezinárodní studii u pacientů, kteří byli po transplantaci

ledviny v riziku rejekce byla zjištěna akutní rejekce častěji ve skupině s Basiliximabem než ve skupině s Thymoglobulinem rATG (Brennan et al. 2006).

Thymoglobulin je králičí antithymocytární globulin (rATG), který způsobuje depleci T buněk např. ve štěpu. (Viklický et al. 2008). V případě neúčinnosti rATG lze výjimečně použít Alemtuzumab (anti-CD52), jedná se o humanizovanou monoklonální protilátku. CD52 se exprimuje na T i B lymfocytech a NK buňkách (Viklický et al. 2008). Rituximab je monoklonální protilátka proti B lymfocytům (anti-CD20) a používá se při odstranění protilátek proti antigenům krevních skupin u transplantace ledvin od žijícího dárce s inkompatibilní krevní skupinou a také jako součást indukční léčby u pacientů s vysokou hladinou DSA (Viklický et al. 2008).

2.10.2 *Udržovací imunosuprese*

Při udržovací imunosupresi jsou základem inhibitory kalcineurinu (takrolimus, v minulosti cyklosporin A) (Ekberg et al. 2007). Tato imunosupresiva se většinou kombinují s mykofenolát mofetilem nebo mykofenolátem sodným a s kortikosteroidy. Léky se musí poddávat v nízkých dávkách, aby nezpůsobily nežádoucí účinky. Inhibitory kalcineurinu, takrolimu a cyklosporinu A se účastní inhibice syntézy interleukinu 2 (Webster et al. 2005). Bohužel léčba takrolimem může být spojena s vyšším rizikem onemocnění diabetes mellitus, toto onemocnění se může projevit po transplantaci ledviny. Léčba cyklosporinem A je spojena s vyšším výskytem např. hyperlipidemie a hypertenze (Viklický et al. 2008). Imunosupresivum Mykofenolát mofetil (MMF) nahradil azathioprin, došlo ke snížení výskytu akutní rejekce a k prodloužení přežití transplantovaných ledvin (Viklický et al. 2008). Kortikosteroidy kombinují protizánětlivé a imunosupresivní účinky. Vysazování kortikosteroidů v časném potransplantačním období je spojeno s vyšším výskytem rejekce (Mourad et al. 2017).

Sirolimus a everolimus se řadí mezi makrolidová imunosupresiva. Jsou to inhibitory savčích receptorů pro rapamycin (mTOR) a mají antiproliferační účinky. Inhibitory mTOR se vyznačují slabou imunosupresivní aktivitou, ale také zpomalují růst některých nádorů. Předností těchto přípravků jsou protivirové účinky a používají se u pacientů se zvýšeným rizikem cytomegalovirové infekce, polyomavirové nefropatie a u pacientů s nádorovým onemocněním (Pascual et al. 2018).

2.10.3 *Antirejekční terapie*

U akutní celulární rejekce se používá opakovaně methylprednisolon, u steroid- rezistentních rejekcí se používá rATG. Akutní humorální rejekce se léčí plazmaferézou a intravenózními globuliny. Intravenózní imunoglobuliny se používají s aferetickými metodami u pacientů před transplantací při průkazu pozitivitu dárcovsky specifických anti-HLA protilátek. Používají se také při léčbě u akutní protilátkami zprostředkované rejekce (ABMR). V řadě center se ABMR léčí rituximabem či bortezomibem (Viklický et al. 2008).

3 Cíle práce

Střední doba přežití štěpů ledvin je 10 let od zemřelého dárce a 14 let od žijícího dárce, postupně dochází k odhojování štěpu. Jednou z kategorií Banffské klasifikace histologických nálezů biopsií ledvinných štěpů jsou hraniční změny (Loupy et al. 2017). Rizikové faktory selhání štěpu u pacientů s hraničními změnami jsou vyšší věk dárce, opožděná funkce štěpu, delší doba strávená na dialýze a diagnóza hraničních změn v období brzy po transplantaci (Hrubá et al. 2019). Je známo, že pacienti, u kterých dojde po hraničních změnách k T buňkami zprostředkované rejekci, mají v době hraničních změn vyšší intrarenální expresi transkriptů asociovaných s imunitní zánětlivou odpovědí (Hrubá et al. 2019).

Hledáme proto nové neinvazivní biomarkery, které by nám pomohly lépe predikovat rozvoj rejekce po diagnóze hraničních změn. Identifikace těchto rizikových pacientů s hraničními změnami by mohla umožnit individualizaci a optimalizaci léčby, případné snížení vedlejších účinků imunosupresiv.

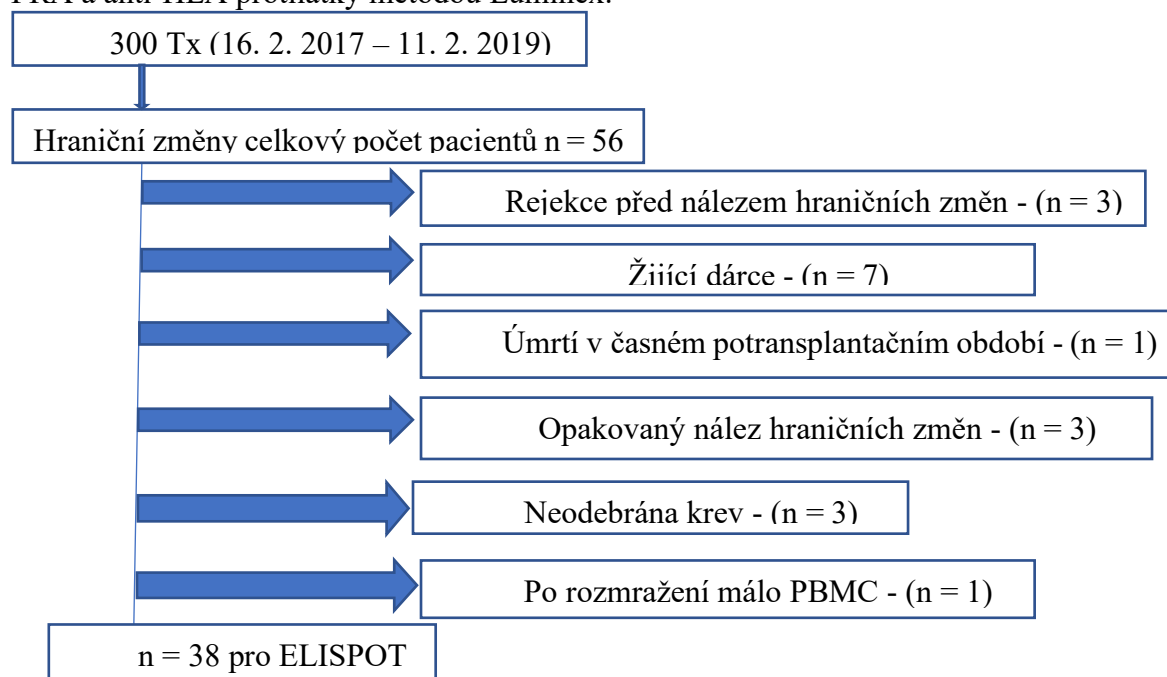
Cílem diplomové práce je identifikovat pomocí nových biomarkerů v době diagnózy hraničních změn, riziko vzniku rejekce v dalším období:

1. Vyšetřením frekvence IFN- γ produkujících buněk po stimulaci buňkami dárce či CMV peptidy v době diagnózy hraničních změn pomocí IFN- γ ELISPOTu.
2. Stanovením chemokinů CXCL10; CXCL9 v moči a CCL17 ze séra u pacientů v době diagnózy hraničních změn.

4 Experimentální část

4.1 Schéma pokusu

Všichni pacienti, kteří měli histologický nález hraničních změn v období brzy po transplantaci nebo v tříměsíční protokolární biopsii, byli prospektivně zařazováni do studie. Za dané období od 16. 2. 2017 do 11. 2. 2019 bylo provedeno celkem 300 transplantací (Tx), z toho 56 nálezů se týkalo Hraničních změn (BL). Ze studie byli vyloučeni tři pacienti s rejekcí před nálezem hraničních změn a sedm pacientů od žijících dárců (od nich nebyly k dispozici zamražené splenocyty). Dále byl vyřazen jeden pacient, který zemřel v časném potransplantačním období a tři biopsie u pacientů s opakovaným nálezem hraničních změn. U třech pacientů nebyla odebrána krev a jeden pacient musel být vyloučen kvůli nedostatečnému množství izolovaných buněk. U všech těchto pacientů ($n = 38$) byl proveden IFN- γ ELISPOT z periferní krve příjemce, odebrané následující den po diagnóze hraničních změn. Po rozhodnutí o zařazení pacienta do studie, byla odložena léčba steroidy až po odběru krve na IFN- γ ELISPOT. Krev na IFN- γ ELISPOT byla odebrána i s odstupem jednoho roku po diagnóze hraničních změn. U všech těchto pacientů byly zároveň stanoveny vybrané cytokiny v moči metodou ELISA (obr. 8). Kohorta pacientů na stanovení cytokinů byla dále zvětšena o pacienty s nálezem hraničních změn, jejichž vzorek moči byl uložen v Biobance Transplantační laboratoře. U všech prospektivně zařazených pacientů byly před transplantací testovány PRA a anti-HLA protilátky metodou Luminex.



Obr. 8: Zařazování pacientů (n počet) do studie pro metodu ELISPOT.

4.2 *Přístroje a chemikálie*

4.2.1 *Přístroje*

- Analyzátor buněk (automated cell counter) TC20 TM, BIO-RAD, USA.
- Sklíčka (Counting Slides Dual Chamber for Cell Counter), BIO-RAD, USA.
- EasySepTM Magnet, Stemcell TM Technologies, Kanada.
- Inkubátor CO₂, ESCO, Singapur.
- Centrifuga ROTINA 420R, Hettich ZENTRIFUGEN, GmbH & Co, Německo.
- Laminární box s UV lampou, ESCO, Singapur.
- Vodní lázeň, TW8, Julabo, Německo.
- ELISPOT reader, AID, Německo.
- ELISA reader BioTek Synergy 2, Microplate Reader, USA.
- Třepačka, Heidolph, Německo.
- Centrifuga Genofuge 16M, Techne, USA.
- Běžný laboratorní materiál, Zkumavky, pipety, špičky.
- Freezing container 1 °C „Mr. Frosty“, Thermo ScientificTM, USA.

4.2.2 *Chemikálie a materiál pro izolaci buněk (z periferní krve příjemců a ze sleziny dárce) a pro metodu IFN- γ ELISPOT*

- Médium RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Medium 1640) s L-glutaminem a hydrogenuhličitanem sodným, Sigma, Německo.
- DMSO Dimethylsulfoxid, Sigma, Německo.
- Ficoll-Paque TM PREMIUM sterile solution, GE Healthcare, Švédsko.
- PBS, pH 7,2-7,4, Lékárna IKEM.
- Fetální telecí sérum (FCS), GE Healthcare, Rakousko.
- Penicilin/Streptomycin, Sigma, Německo.
- DNase 1, RNase-free, ThermoFisher Scientific, Lithuania.
- Trypanová modř 0,4 % roztok, BIO-RAD, USA.
- Souprava ELISPOT Interferon- γ , AID, Německo, (96 stripová destička potažená protilátkou, Dilution buffer (VP), Washing Buffer (WP 10x koncentrát), AP- konjugovaná sekundární protilátka (koncentrát), Substrát (BCIP/NBT).
- EDTA, Sigma-Aldrich, Švýcarsko.

- EasySep Human CD2 Positive Selection Kit, Stemcell TM Technologies, Kanada
– Easy SepTM Human CD2 Positive Selection Cocktail, EasySEPTM Magnetic Nanoparticles Positive Selection.
- Pokeweed, AID, Německo.
- CMV IE-1 peptide pool, AID, Německo.
- CMV pp65 peptide pool, AID, Německo.
- Erythrocyte Lysis Buffer, QIAGEN, Německo.

4.2.3 *Chemikálie a materiál pro metodu ELISA (CXCL10, CXCL9, CCL17)*

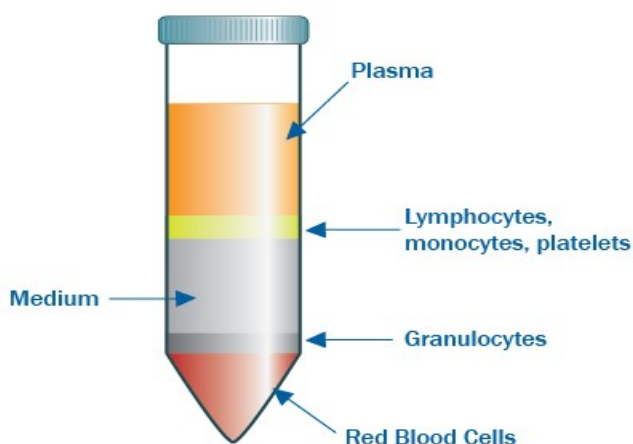
- CXCL10 (Human CXCL10/IP10 Immunoassay, R&D systems) - 96 - Destičky IP-10, IP-10 Standart, IP-10 Konjugát, Assay Diluent RD1-56, Calibrator Diluent RD5K, Calibrator Diluent RD6Q, Wash Buffer (promývací pufr koncentrát), Color Reagent A a B, Stop Solution, USA.
- CXCL9 (Human CXCL9/MIG DuoSet, R&D systems) – 96 - Destičky, Substrát (1:1 Color Reagent A a B), Stop, PBS, Wash Buffer (promývací pufr koncentrát), Reagent Diluent koncentrát 2, Human MIG Capture Antibody, Human MIG Detection Antibody (naředěno v 1 ml Reagent Diluentu), Human MIG Standart (naředit v 0,5 ml Reagent Diluentu), Streptavidin-HRP B, USA.
- CCL17 (Human CCL17/TARC DuoSet, R&D systems) - 96 - Destičky, Substrát (1:1 Color Reagent A a B, Stop, PBS, Wash Buffer (promývací pufr koncentrát), Reagent Diluent koncentrát 2, Human TARC Capture Antibody, Human TARC Detection Antibody (naředit v 1 ml Reagent Diluentu), Human TARC Standart (naředěno v 0,5 ml Reagent Diluentu), Streptavidin-HRP B, USA.

4.3 Metody

4.3.1 *IFN- γ Enzyme-linked Immunosorbent spot assay (ELISPOT)*

Izolace buněk příjemce z periferní krve

Periferní krev pacientů byla odebírána následující den po diagnóze hraničních změn, vždy před zahájením léčby steroidy. Krev byla odebírána do 3 zkumavek (zelených, citrátových) v celkovém množství asi 15 - 20 ml. Izolace mononukleární buněk periferní krve (PBMC) byla prováděna za sterilních podmínek v sterilním laminárním boxu s UV lampou, ESCO. Krev byla přenesena do falkonové zkumavky a zředěna sterilním PBS (pH 7,2 - 7,4) do finálního objemu 35 ml (např. 15 ml krve s 20 ml sterilním PBS). Zředěná krev byla opatrně převrstvena sterilní 10 ml pipetou na 12,5 ml roztoku Ficoll-Paque v nové falkonově zkumavce. Zkumavky byly centrifugovány 1000 g, 20 min při pokojové teplotě, přičemž došlo k oddělení jednotlivých vrstev, vrstva 1: plasma/PBS, vrstva 2: PBMC, mononukleární buňky nebo (splenocyty – buňky dárce), vrstva 3: Ficoll-Paque roztok, vrstva 4: červené krvinky/granulocyty (obr. 9). Vzniklý prstenec PBMC vrstvy byl Pasteurovou pipetou vložen do nové zkumavky a 2x promyt sterilním PBS. PBMC byly vždy doplněny PBS do objemu 50 ml, centrifugovány 280 g, 10 min při pokojové teplotě (při druhém promytí při nižších otáčkách 210 g). Supernatant byl vylit a buňky v peletě roztřepány „finger flipping“ a naředěny 10 ml – 15 ml kompletního média (RPMI-1640 s glutamátem, 10 % fetální telecí sérum a 1 % penicilin/Streptomycin). Buňky byly spočítány pomocí Analyzátoru buněk BIO- RAD a zamraženy viz dále.



Obr. 9: Vrstvy jsou prezentovány ve zkumavce jako plasma, PBMC mononukleární buňky, granulocyty a červené krvinky. Převzato z: <https://www.novusbio.com/antibody->

news/isolating-immune-cells-from-peripheral blood-how-and-when-to-use-density-gradient-centrifugation.

Izolace splenocytů dárce

Po celou dobu zařazování pacientů do studie byly izolovány splenocyty ze slezin všech dárců transplantovaných ledvin. Část sleziny, odebraná dárci, byla uchována v PBS při 5 °C a během 24 hodin z ní byly izolovány splenocyty. Pomocí sterilních nůžek byly na Petriho misce odděleny kousky sleziny, a ty byly pasírovány přes žluté sítko do 50 ml falkonové zkumavky s menším množstvím sterilního PBS (pH 7,2 - 7,4). PBS bylo doplněno do finálního objemu 35 ml. Do nové falkonové zkumavky bylo napipetováno 12,5 ml roztoku Ficoll-Paque a na něj bylo opatrně převrstveno sterilní 10 ml pipetou 35 ml splenocytů, zředěných PBS. Zkumavky byly centrifugovány při 1000 g, 20 min při pokojové teplotě. Centrifugací došlo k oddělení jednotlivých vrstev (obr. 9) a vytvoření prstence splenocytů. Prstenec splenocytů byl Pasteurovou pipetou vložen do nové zkumavky a 2x promyt 50 ml PBS. Po přidání PBS byly zkumavky centrifugovány 280 g, 10 min při pokojové teplotě, supernatant slit a buňky v peletě na dně roztřepány „finger flipping“. Pokud nebyly červené krvinky dostatečně zlyzovány, bylo k peletu přidáno 10 ml Erythrocyte Lysis Buffer, poté buňky byly inkubovány při pokojové teplotě 5 min. Při druhém promytí peletu byly zkumavky centrifugovány 210 g, 10 min při pokojové teplotě. Supernatant byl vylit a buňky v peletě roztřepány „finger flipping“ a naředěny 10 ml – 15 ml kompletního média (RPMI-1640 s glutamátem, 10 % fetální telecí sérum a 1 % penicilin/Streptomycin). Malé množství buněk bylo odebráno (10 µl) a obarveno v poměru 1:1 Trypanovou modří (BioRAD) a po nanesení suspenze na speciální sklíčko (Counting Slides Dual Chamber for Cell Counter, BIO-RAD, USA) byly spočítány pomocí Analyzátoru buněk BIO-RAD. Splenocyty byly dále zmrazeny.

Zmrazování buněk

U splenocytů bylo zamražován nadbytek buněk cca 50 - 75 miliónů buněk, kvůli následné CD2 depleci a u PBMC příjemce jsme zamrazovali všechny zizolované buňky přibližně 15 milionů buněk. Buňky byly naředěny na koncentraci cca 5 miliónů buněk na 0,5 ml mrazícím médiem Freezing Media Soution 1, složeného z fetálního séra a RPMI-1640 s glutamátem v poměru 2:3. Poté byly buňky napipetovány po 0,5 ml do kryozkumavek. Buňky i všechny reagenty byly uchovávány na ledu.

Následně bylo pomalu přidáno 0,5 ml mrazicího média 2 (DMSO a fetálního sérum v poměru 1:4). Kryozkumavky byly opatrně promíchány a vloženy do vychlazeného mrazicího boxu (Mr. Frosty) a i s ním do - 80 °C na 12 hodin. Poté byly odneseny na zmrazení do tekutého dusíku, ve kterém byly uchovávány až do použití.

Rozmrazování buněk

PBMC buňky příjemce nebo splenocyty byly po vyjmutí z tekutého dusíku převedeny přes rozmrazovací médium do kompletního média (RPMI-1640 s glutamátem, 10 % fetální telecí sérum a 1 % penicilin/streptomycin) a inkubovány 2 hod při 37 °C a 5 % CO₂. Kryozkumavky přenesené z dusíku byly opatrně vloženy do vodní lázně při 37 °C a pomalu rozmrazovány. V okamžiku, kdy buňky ještě nebyly úplně rozmražené, ale už je bylo možné ze zkumavky „vyklopit“, byly přeneseny do 15 ml/50 ml falkonové zkumavky s 10 ml/20 ml zahřátého rozmrazovacího média (fetální telecí sérum a RPMI-1640 s glutamátem v poměru 1:4, dále 1 U/μl Dnase1, 1 % Penicilin/Streptomycin). PBMC buňky byly přeneseny do 15 ml zkumavek (splenocyty do 50 ml zkumavek). Zkumavky byly centrifugovány 280 g, 10 min při pokojové teplotě. Supernatant byl vylit a buňky v peletě roztřepány „finger flipping“. K buňkám příjemce bylo opět přidáno 10 ml zahřátého rozmrazovacího média a k slezinným buňkám 20 ml zahřátého rozmrazovacího média. Zkumavky byly centrifugovány 280 g, 10 min při pokojové teplotě. Supernatant byl vylit a buňky v peletě roztřepány „finger flipping“. Na závěr bylo přidáno kompletní médium (RPMI-1640 s glutamátem, 10 % fetálního séra a 1 % penicilin/streptomycin) pro buňky příjemce 2 ml, pro buňky dárce 5 ml. Buňky byly inkubovány 2 hod při 37 °C a 5 % CO₂. Po inkubaci byly buňky příjemce přepočteny Analyzátozem buněk BIO-RAD.

CD2 deplece

Princip: CD2 protilátky navázané na lymfocyty s CD2 antigenem se odseparují pomocí magnetu.

Splenocyty dárce byly inaktivovány pomocí CD2 deplece, čímž se zabránilo tomu, aby produkovaly IFN-γ. Do 15 ml falkonové zkumavky byla vložena suspenze $7,5 \times 10^7$ (nebo X) splenocytů pro CD2 depleci. Buňky byly centrifugovány 280 g, 10 min při pokojové teplotě. Supernatant bylo potřeba pečlivě odsát, pelet byl roztřepán v 750 μl deplečního pufru. Depleční pufr obsahoval 10 μl 0,5M EDTA, 100 μl fetálního séra do finálního objemu 5 ml PBS. Suspenze buněk byla vložena do sterilní 5 ml FACS

zkumavky. Pokud bylo buněk menší nebo naopak větší množství než $7,5 \times 10^7$, bylo poupraveno množství deplečního pufru, EasySep positive selection kitu a EasySep magnetic nanoparticle následovně ($X \times 10^7$ buněk, $X \times 100 \mu\text{l}$ deplečního pufru, $X \times 15 \mu\text{l}$ EasySep positive selection kit, $X \times 7,5 \mu\text{l}$ EasySep magnetic nanoparticle).

K suspenzi bylo přidáno $112,5 \mu\text{l}$ EasySep positive selection kitu, jemně byla suspenze propipetována. Dále následovala inkubace suspenze 15 min při pokojové teplotě. A poté bylo přidáno $56,3 \mu\text{l}$ suspenze magnetických kuliček (EasySep magnetic nanoparticle) a celá suspenze byla následně promíchána a 10 min inkubována při pokojové teplotě. Byl přidán depleční pufir do objemu 2,5 ml. Zkumavka byla dána na 10 min do EasySep magnetu, a poté v magnetu byl supernatant slit do nové zkumavky, která byla opět vložena na 10 min do EasySep magnetu. Dále byl supernatant slit do 15 ml falkonové zkumavky a k suspenzi bylo přidáno 10 ml sterilního PBS. Zkumavky byly centrifugovány 280 g, 10 min při pokojové teplotě. Supernatant byl opatrně resuspendován a bylo přidáno (1 - 2 ml kompletního média dle velikosti peletu).

Splenocyty byly přepočítány pomocí Analyzátoru buněk BIO-RAD ($10 \mu\text{l}$ suspenze nanesené na počítací sklička obarvené v poměru 1:1 Trypanovou modří (v koncentraci 300 000 buněk/ $100 \mu\text{l}$ – 3 miliony buněk/ 1 ml kompletního média, na provedení allo- ELISPOTu bylo potřeba 3 milióny splenocytů).

IFN- γ Enzyme-linked Immunosorbent spot assay (ELISPOT)

Allospecifické a CMV specifické T lymfocyty u pacientů v době diagnózy hraničních změn před zahájením léčby steroidy a rok po diagnóze ($n = 40$) jsou hodnoceny pomocí IFN- γ ELISPOTu. PBMC buňky příjemce a dárce byly napipetovány v množství 300 000 buněk/ $100 \mu\text{l}$ na destičku ELISPOTu. Buňky příjemce byly stimulovány inaktivovanými splenocyty dárce, CMV peptidy ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$ pp65 a IE1) po dobu 24 hodin při 37°C a 5 % CO_2 . Pozitivní kontrolou byly PBMC stimulované pokeweed mitogenem (AID, Germany) a negativní kontrolou byly PBMC inkubované v kompletním médiu, které byly rovněž po $100 \mu\text{l}$ napipetovány (obr. 10).

Po 24 hodinách byla provedena vizualizace a vyvolání reakce sekundární protilátkou. Byl připraven Washing buffer naředěním 10x koncentrovaného zásobního roztoku (40 ml s 360 ml destilované vody). ELISPOT destička byla 5x promyta $200 \mu\text{l}$ Washing bufferu. Po vysušení destičky byla přidána sekundární protilátka (na 4 stripy: $16 \mu\text{l}$ Sekundární protilátky a $3,984 \text{ ml}$ Dilution bufferu). Destička byla

inkubována při pokojové teplotě 2 hodiny. Poté byla destička vylita a opět promyta pětkrát 200 µl Washing bufferu. Destička byla vysušena a následně bylo přidáno 100 µl substrátu. Dále byla destička 5 min inkubována a poté byla reakce zastavena promytím pod tekoucí vodou. Následovalo vysušení destičky a po 2 h byl stanoven počet secernujících paměťových IFN-γ buněk pomocí ELISPOT readeru (AID, Germany).

1	2	3	4
neg + D	neg + D	x	x
neg + R1	neg + R1	D + R1	D + R2
pp65 + R1	IE-1 + R1	D + R1	D + R2
pp65 + R1	IE-1 + R1	D + R1	D + R2
pp65 + R2	IE-1 + R2	D + R1	D + R2
pp65 + R2	IE-1 + R2	D + R1	D + R2
pokeweed + R1	pokeweed + R1	pokeweed + R2	pokeweed + R2
neg + R2	neg + R2	x	x

Obr. 10: Pipetovací schéma destičky ELISPOTu. **Neg:** negativní kontrola (kompletní médium), **pokeweed:** pozitivní kontrola, **R1:** PBMC příjemce ledviny v době diagnózy hraničních změn, **R2:** PBMC příjemce ledviny 1 rok po diagnóze hraničních změn, **D:** inaktivované splenocyty dárce, pp65 a IE1: CMV peptidy.

4.3.2 ELISA CXCL10/IP10, CXCL9/MIG, CCL17/TARC

Vzorky moče pacientů byly odebrány před provedením biopsie s nálezem hraniční změny (časné hraniční změny, n = 26 a hraniční změny diagnostikované v tříměsíční protokolární biopsii, n = 36) a uloženy při - 80 °C do Biobanky Kliniky nefrologie. V moči pak bylo metodou ELISA stanoveno množství chemokinu CXCL10 (Human CXCL10/IP10 Immunoassay, R&D systems); chemokin CXCL9 (Human CXCL9/MIG DuoSet, R&D systems) a ze séra pacientů byl stanoven chemokin CCL17 (Human CCL17/TARC DuoSet, R&D systems).

CXCL10/IP10

Do destičky do každého stripu bylo přidáno 150 µl Assay Diluent RD1-56. Nejprve byla připravena kalibrační řada s Human IP-10 Standardem (Standard byl rozpuštěn v destilované vodě na výslednou koncentraci 5000 pg/ml). Do první zkumavky byl napipetován po 900 µl Calibrator Diluent RD5K (v koncentraci 500 pg/ml), do dalších šesti zkumavek byl přidán po 500 µl. Do první zkumavky bylo napipetováno

100 µl Human IP-10 Standardu a následně množství z první zkumavky bylo přepipetováno postupně až do poslední sedmé zkumavky po 500 µl tak, aby 1. zkumavka obsahovala koncentraci 500 pg/ml, 2. zkumavka 250 pg/ml, 3. zkumavka 125 pg/ml, 4. zkumavka 62,5 pg/ml, 5. zkumavka 31,3 pg/ml, 6. zkumavka 15,6 pg/ml a 7. zkumavka 7,8 pg/ml.

Následně bylo přidáno v dubletu po 100 µl kalibrační řady, dále 100 µl kontroly (negativní kontrola-slepý vzorek) a patientské vzorky moče. Následovala inkubace 2 hodiny při pokojové teplotě. Poté byla destička 3x promyta Wash buffrem (400 µl). Wash Buffer byl připraven naředěním zásobního roztoku (20 ml s 480 ml destilované vody). Do každé jamky bylo přidáno 200 µl Human IP-10 Conjugatu, následovala 2 hodinová inkubace při pokojové teplotě. Opět byla destička promyta Wash buffrem (400 µl) 3x a destička byla osušena. Poté následovala inkubace destičky 30 min s 200 µl Substrátu (smíchán Color A a B) při pokojové teplotě, destička byla uzavřena a chráněna před světlem. Nakonec byl přidán roztok Stop a reakce byla zastavena. Destička byla měřena do 30 min ELISA readerem při 450 nm.

CXCL9/MIG

Capture antibody byla nejprve rozpuštěna v 0,5 ml PBS (360 µg/ 500 µl PBS), dále byla naředěna 60x na pracovní koncentraci 6 µg/ml. Do každé jamky destičky bylo napipetováno 100 µl Capture Antibody a byla inkubována při pokojové teplotě 24 hodin. Druhý den byla destička 3x promyta 400 µl Wash Buffrem a poté byla vysušena. Destička byla zablokována 300 µl Reagent Diluentu (který byl naředěn 10x s PBS, např. 2 ml koncentrátu a 18 ml PBS) a byla inkubována hodinu při pokojové teplotě. Pak byla znovu 3x promyta 400 µl Wash Buffru a vysušena. Byla připravena kalibrační řada se Standardem (340 ng/500 µl v Reagent Diluentu) a naředěna na pracovní koncentrace 62,5 – 4000 pg/ml. Do 1. zkumavky bylo napipetováno množství 10 µl Standardu a 1690 µl Reagent Diluentu, do ostatních šesti zkumavek bylo napipetováno po 500 µl Reagent Diluentu. Z první zkumavky bylo přepipetováno množství postupně až do poslední sedmé zkumavky po 500 µl, tak aby 1. zkumavka obsahovala koncentraci 4000 pg/ml, 2. zkumavka 2000 pg/ml, 3. zkumavka 1000 pg/ml, 4. zkumavka 500 pg/ml, 5. zkumavka 250 pg/ml, 6. zkumavka 125 pg/ml a 7. zkumavka 62,5 pg/ml.

Následně bylo přidáno v dubletu 100 µl vzorků moče pacientů, 100 µl kalibrační řady a 100 µl negativní kontroly. Destička byla 2 hodiny inkubována při pokojové teplotě.

Destička byla 3x promyta 400 μ l Wash Buffru a vysušena. Poté byla inkubována 2 hodiny s Detection Antibody (12 μ g/ 1 ml Reagent Diluentu naředěno 60x na pracovní koncentraci 200 ng/ml bylo napipetováno po 100 μ l do jednotlivých jamek destičky. Destička byla opakovaně promyta 400 μ l Wash Buffru 3x a vysušena. 100 μ l Streptavidinu-HRP B (koncentrát Streptavidinu byl rozpuštěn v Reagent Diluentu) bylo napipetováno do destičky a dále destička byla inkubována po dobu 20 min při pokojové teplotě. Destička byla chráněna před přímým světlem. Destička byla 3x promyta 400 μ l Wash Buffrem a vysušena. Poté bylo přidáno 100 μ l roztoku Substrátu (smíchán Color A a B) a nastala 20 min inkubace při pokojové teplotě ve tmě. Nakonec byl přidán 50 μ l roztok STOP a reakce byla zastavena. Destička byla ihned změřena ELISA readerem při 450 nm.

CCL17/TARC

Capture antibody byla nejprve rozpuštěna s 0,5 ml PBS (120 μ g/ 500 μ l PBS), dále byla naředěna 60x na pracovní koncentraci 2 μ g/ml. Jednotlivé jamky destičky byly potaženy 100 μ l Capture Antibody a destička byla inkubována při pokojové teplotě 24 hodin. Druhý den byla destička 3x promyta 400 μ l Wash Buffru a poté vysušena.

Destička byla zablokována 300 μ l Reagent Diluentem (který byl naředěn 10x s PBS, např. 2 ml koncentrátu a 18 ml PBS) a byla po dobu 1 hodiny inkubována při pokojové teplotě. Destička byla 3x promyta 400 μ l Wash Buffru a vysušena. Byla připravena kalibrační řada se Standardem (70 ng/500 μ l Reagent Diluentu) naředěného na pracovní koncentrace 7,81 – 500 pg/ml. Do 1. zkušavky bylo napipetováno množství 10 μ l Standardu a 2790 μ l Reagent Diluentu, do ostatních šesti zkušavek bylo napipetováno po 500 μ l Reagent Diluentu. Z první zkušavky bylo přepipetováno množství postupně až do poslední sedmé zkušavky po 500 μ l tak, aby 1. zkušavka obsahovala koncentraci 500 pg/ml, 2. zkušavka 250 pg/ml, 3. zkušavka 125 pg/ml, 4. zkušavka 62,5 pg/ml, 5. zkušavka 31,3 pg/ml, 6. zkušavka 15,6 pg/ml a 7. zkušavka 7,81 pg/ml.

Následně bylo přidáno v dubletu 100 μ l patientských vzorků moče, 100 μ l kalibrační řady a 100 μ l negativní kontroly (slepý vzorek). Destička byla 2 hodiny inkubována, a to pouze při pokojové teplotě. Destička byla 3x promyta 400 μ l Wash Buffru a vysušena. Detection Antibody (6 μ g/ 1 ml Reagent Diluent naředěného 60x na pracovní koncentraci 100 ng/ml) bylo napipetováno do jamek destičky po 100 μ l a destička byla poté 2 hodiny inkubována. Destička byla 3x promyta 400 μ l Wash Buffru a vysušena. Streptavidin-HRP B (koncentrát Streptavidinu byl rozpuštěn v Reagent Diluentu)

a 100 μ l bylo napipetováno do destičky a destička byla inkubována po dobu 20 min při pokojové teplotě a uschována ve tmě. Destička byla 3x promyta 400 μ l Wash Buffru a vysušena. Poté bylo přidáno 100 μ l roztoku Substrátu (smíchán Color A a B) a nastala 20 min inkubace při pokojové teplotě ve tmě. Nakonec byl přidán 50 μ l roztok STOP a reakce byla zastavena. Destička byla ihned změřena ELISA readerem při 450 nm.

4.3.3 *BKV PCR*

Stanovení BK viru metodou RT-PCR v plasmě bylo stanoveno na oddělení Lékařské genetiky v IKEM. Krev (5 ml) byla odebrána do zkumavky s K3EDTOU, aby nedošlo ke sražení krve. Krev byla centrifugována nejpozději do 6 hodin od odběru primárního vzorku. Vzorek byl zamražen a rozmražen pouze jednou, tak aby nedošlo k falešným výsledkům. Následovala izolace DNA (Proteinkináza K s Proteinase Bufferem, Buffer B5 s ethanolem a Buffer B3) a samotná analýza PCR s použitím přístroje Corbett Rotor-Gene a programu Rotor gene 6000 s kitem BKV – ALTONA – RealStar® BKV PCR Kit.

4.3.4 *Statistické zpracování dat*

Spojité proměnné byly porovnány pomocí Mann-Whitney testu a kategorické proměnné pomocí chi-kvadrát testu. Dále byl použit pro spojité proměnné, Wilcoxon-signed rank test. Pro stanovení potenciální prediktivní hodnoty jednotlivých biomarkerů byla použita ROC analýza a výpočet plochy pod křivkou (AUC). Kaplan-Meier analýza byla použita pro porovnání rejection-free interval. Statistická analýza byla provedena pomocí SPSS v.20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) a GraphPad InStat v.3.05 for Windows (GraphPad software, San Diego, CA). Výsledky jsou statisticky významné, pokud $p < 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Chemokiny v době tříměsíční protokolární biopsie s hraničními změnami (ELISA)

V souboru 40 pacientů (příjemců), kteří měli v tříměsíční protokolární biopsii diagnostikovány hraniční změny, bylo po této diagnóze 31 pacientů bez rejekce a 9 pacientů s rejekcí. Devět pacientů vyvinulo následně po hraničních změnách rejekci, z toho 7 pacientů vyvinulo chronickou humorální rejekci a 2 pacienti akutní TCMR. Klinické a demografické údaje jsou popsány v (Tab. 2).

Pacienti, kteří po hraničních změnách vyvinuli rejekci, se od pacientů bez rejekce nelišili v základních klinických parametrech jako věk příjemce, dárce atd. Statisticky se významně lišili hladinou PRA, která byla u skupiny s rejekcí vyšší (medián 76) než u skupiny bez rejekce (medián 8) ($p = 0,002$).

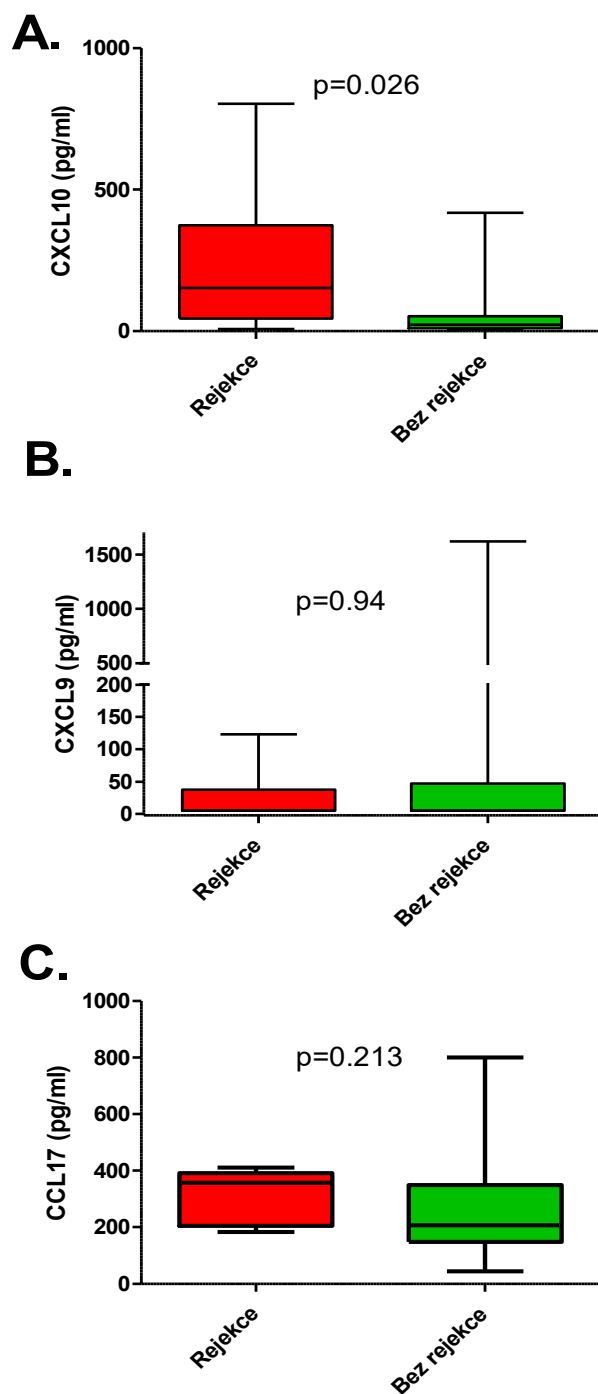
Tab. 2: Demografická charakteristika pacientů s hraničními změnami v tříměsíční protokolární biopsii ($n = 40$). Spojité proměnné byly porovnány Mann-Whitney testem a kategorické proměnné chi-kvadrát testem.

	Bez rejekce ($n = 31$)	S rejekcí ($n = 9$)	p
Věk příjemce (roky)*	50 [31, 71]	51 [22,76]	0,604
Pohlaví příjemce, muži, n (%)	18 (58 %)	5 (55,6 %)	1
Retransplantace, n (%)	5 (16,13 %)	4 (44,4 %)	0,168
Žijící dárce, n (%)	4 (12,9 %)	0 (0 %)	0,693
Věk dárce (roky)*	49 [16, 75]	44 [18, 61]	0,381
Pohlaví dárce, muži, n (%)	15 (48,4 %)	6 (66,7 %)	0,457
Dialýza (měsíce)*	16 [0,107]	28 [7,77]	0,166
Panel reaktivní protilátky (max)*	8 [0, 66]	76 [0, 98]	0,002
HLA neshoda*	3 [0,5]	3 [0, 5]	0,919
Studená ischemie (hod)*	13 [1, 20]	15 [2, 24]	0,292
Opožděná funkce štěpu, n (%)	5 (16,13 %)	3 (33,3 %)	0,355
Depleční indukční léčba, n (%)	22 (70,97 %)	9 (100 %)	0,09
Kreatinin v době biopsie (umol/l) *	115 [54,173]	138 [82, 267]	0,264
CXCL10 v době biopsie (pg/ml) *	22 [5, 418]	151 [7, 804]	0,026

CXCL9 v době biopsie (pg/ml) *	115 [54,173]	5 [5, 123]	0,935
CCL17 v době biopsie (pg/ml) *	213 [44,800]	357 [183,411]	0,213

* Data jsou prezentována jako medián [min, max]. Kategorické proměnné byly vyjádřeny počtem (n) a procenty.

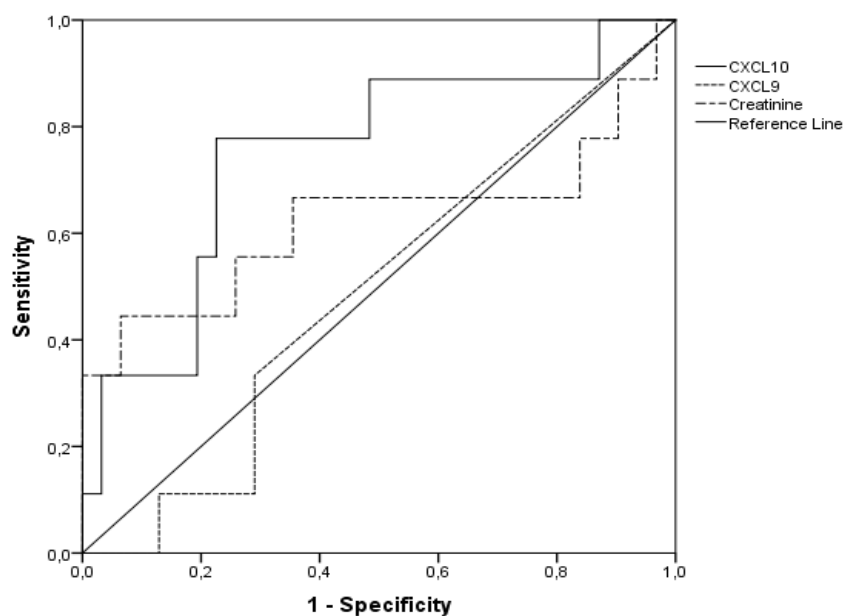
Pacienti s rejekcí mají vyšší koncentraci chemokinu CXCL10 (medián 151) než pacienti bez rejekce (medián 22) ($p = \mathbf{0,026}$). U chemokinů CXCL9 ($p = 0,935$) a CCL17 ($p = 0,213$) výsledky naznačují, že skupiny pacientů bez rejekce a s rejekcí se významně neliší (obr. 11). Chemokin CCL17 byl měřen nejprve v moči pacienta, kde tento chemokin nebyl detekován a poté ze séra pacienta.



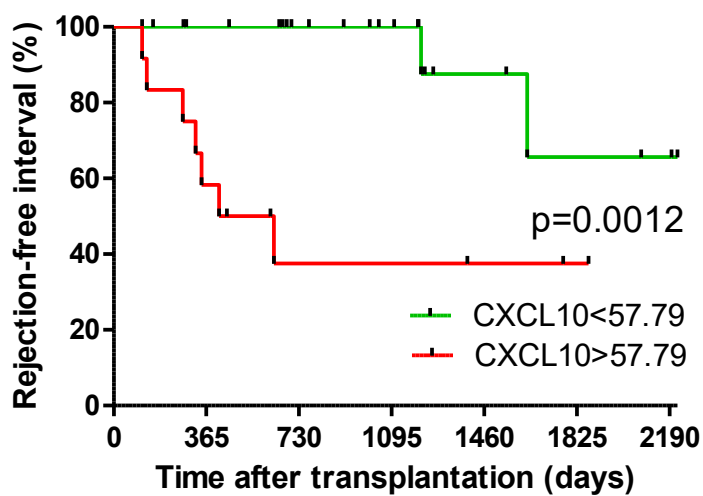
Obr. 11: Srovnání chemokinů CXCL10 ($p = 0,026$), CXCL9 ($p = 0,935$) a CCL17 ($p = 0,213$). Mann Whitney test.

Pomocí ROC křivky (receiver operating curve) a stanovení plochy pod křivkou (AUC) jsme vypočítali predikční schopnost hladin jednotlivých chemokinů pro následnou rejekci po diagnóze hraničních změn ve 3. měsíci ($n = 40$). Jako nejlepší prediktor následné rejekce s nejvyšší AUC (0.749) byl chemokin CXCL10 ($p = 0.024$), který predikoval rejekci lépe než hladina kreatininu ze séra (AUC = 0.624; $p = 0.264$). Sensitivita a specificita testu pro predikci rejekce po hraničních změnách ve 3. měsíci na základě stanovení hladiny CXCL10 v moči v době biopsie byla 77,8 % a 77,4 % při cut-off 57,79 pg/ml (obr. 12A). Na základě cut-off, vypočteného ROC analýzou, jsme stanovili pomocí Kaplan-Meier analýzy rejection-free interval (dobu do objevení rejekce) u pacientů s hladinou chemokinu CXCL10 v moči nad a pod cut-offem 57,79. Osa x specifikovala dobu od transplantace a osa y procentuální podíl pacientů bez rejekce. Při hladině chemokinu CXCL10 v moči v době biopsie $> 57,79$ měli pacienti kratší dobu do objevení rejekce po této biopsii (vyjádřeno ve dnech) po transplantaci ($p = 0,0012$; obr. 12B).

A.



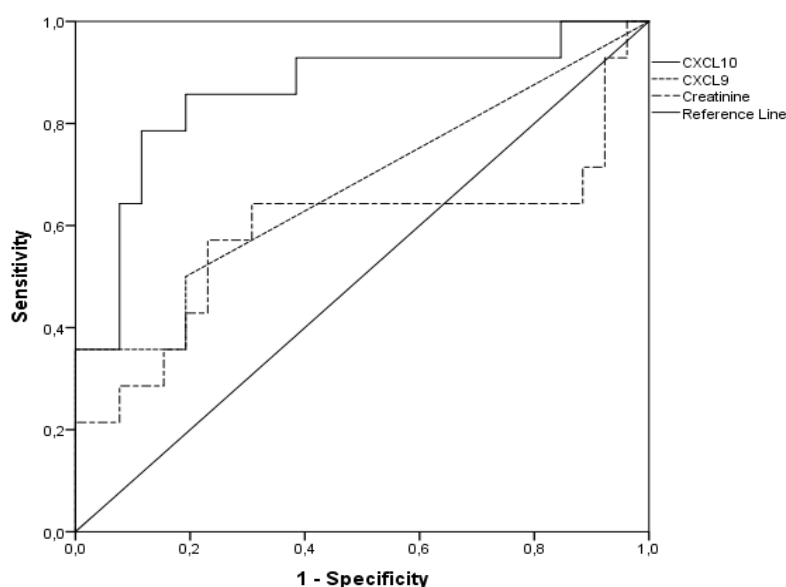
B.



Obr. 12: CXCL10 v moči pacientů s BL ve 3M (n = 40) predikuje rozvoj TCMR, prognostický význam chemokinů CXCL10 a CXCL9 v moči pacientů v době hraničních změn pro následný rozvoj rejekce.

- A. ROC analýza. AUC (CXCL10) = 0.749, $p = 0.024$, AUC (CXCL9) = 0.491, $p = 0.935$, AUC (Creatinine) = 0.624, $p = 0.264$.
- B. Kaplan-Meier rejection-free interval u pacientů s hladinou CXCL10 v moči nad a pod cut-offem stanoveným ROC analýzou.

CXCL10 je markerem rejekce, dysfunkce ledvinového štěpu, ale i infekce. Jeho hladina může být zvýšená, nejen při rejekci, ale i s infekcí (cytomegalovirovou nebo BKV infekcí). Proto jsme sestrojili ROC křivku pro predikci s pacienty, kteří měli buď rejekci do 1 roka nebo pozitivní BKV PCR ve 3. měsíci (obr. 13).



Obr. 13: CXCL10 jako nespecifický marker rejekce i infekce. ROC křivka pro predikci pacientů s hraničními změnami ve 3. měsíci, kteří buď následně vyvinuli rejekci nebo měli v době hraničních změn současně pozitivní BKV PCR na základě stanovení hladiny CXCL10 a CXCL9 v moči a kreatininu v séru v době hraničních změn.

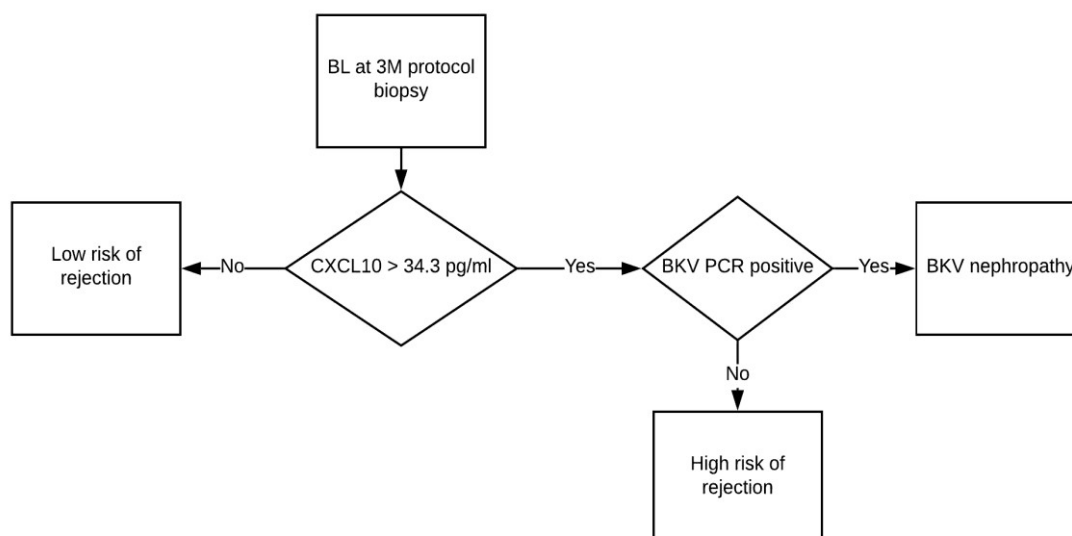
CXCL10 predikuje rejekci do roka nebo BKV (či jinou infekci) v době odběru se sensitivitou 84,6 % a specificitou 82,6 % při cut off 34,3 pg/ml ($p < 0,001$). V tabulce (Tab. 3) vidíme pro srovnání plochu pod křivkou AUC CXCL10 a AUC kreatininu při biopsii. Pokud jsme do modelu zahrnuli i predikci močové infekce v době odběru, predikční schopnost CXCL10 se významně zvýšila (AUC se zvýšila z 0,749 na 0,860) (Tab. 3).

Vidíme opět, že chemokin CXCL10 je lepší biomarker ke stanovení rejekce do roka nebo infekce v době odběru než hladina CXCL9 nebo hladina kreatininu v séru. $AUC (CXCL10) = 0,86$, $p < 0,001$, $AUC (CXCL9) = 0,674$, $p = 0,072$, $AUC (kreatininu) = 0,585$, $p = 0,379$ (Tab. 3).

Tab. 3: Porovnání kreatininu s chemokiny CXCL10 a CXCL9 u pacientů s rejekcí do 1 roka a s pozitivní BKV PCR ve 3M, plocha pod křivkou AUC, p value, cut-off, sensitivita a specificita testu.

	AUC	p	cut-off	sensitivita	specificita
CXCL10	0,86	< 0,001	34,3	85,7	85,7
CXCL9	0,674	0,072	19,09	50	80,8
Kreatinin	0,585	0,379	118,05	64,3	65,4

Pokud by lékař potřeboval identifikovat pacienta s hraničními změnami, který je v riziku následného rozvoje rejekce nebo má v době biopsie močovou infekci, mohl by dle schéma (viz níže) v době biopsie stanovit v moči hladinu CXCL10 pomocí metody ELISA. V případě, že by hladina CXCL10 v době biopsie byla nižší než 34,3 pg/ml, tak je pacient nízkorizikový. V opačném případě (vyšší než 34,3 pg/ml), je třeba vyloučit probíhající močovou infekci (BKV PCR). Pokud je pacient bez infekce, a přesto má zvýšenou hodnotu CXCL10, má vysoké riziko následné rejekce a měl by být pečlivě sledován (obr. 14).



Obr. 14: Schéma pro rozlišení rejekce od infekčního onemocnění (nephropatie).

Ani hladina CXCL9 v moči, ani hladina CCL17 u pacientů s hraničními změnami v 3M protokolárních biopsiích nepredikuje rejekci (CXCL9 AUC = 0,491, p = 0,935; CCL17 AUC = 0,664, p = 0,145).

5.2 Chemokiny v době časné indikační biopsii s hraničními změnami (ELISA)

V souboru bylo 25 pacientů (příjemců), kteří měli v časné indikační biopsii diagnostikovány hraniční změny. Po této diagnóze bylo 16 pacientů bez rejekce a 9 pacientů vyvinulo následně po hraničních změnách rejekci. Z toho 7 pacientů vyvinulo chronickou humorální rejekci a 2 pacienti akutní TCMR. Klinické a demografické údaje jsou popsány v (Tab. 4).

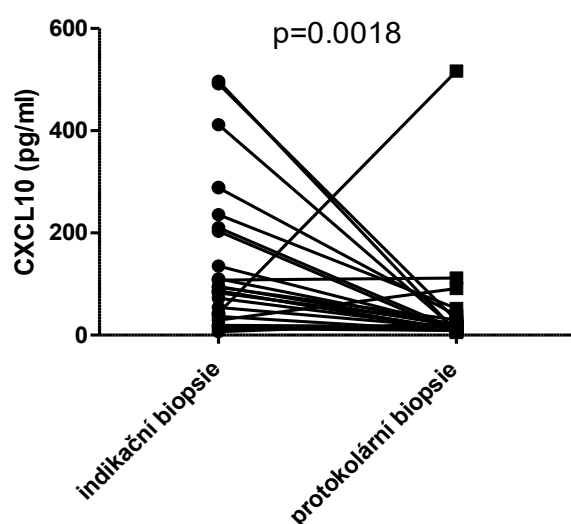
Pacienti, kteří po hraničních změnách vyvinuli rejekci, se od pacientů bez rejekce nelišili s ohledem na věk a pohlaví příjemce, dále na délku dialýzy, hladinu PRA, HLA mismatch a na délku studené ischemie. Pacienti, kteří po časných hraničních změnách, vyvinuli rejekci, měli významně starší dárce (medián 67 vs 51, $p = 0,008$). Překvapivě měli pacienti s následnou rejekcí méně často opožděnou funkci štěpu v prvním týdnu po transplantaci (33,3 % v porovnání s 93,8 % u skupiny bez rejekce; $p = 0,003$) (Tab. 4).

Tab. 4: Demografická charakteristika pacientů s hraničními změnami v časné indikační biopsii ($n = 25$). Spojité proměnné byly porovnány Mann-Whitney testem a kategorické proměnné chi-kvadrát testem.

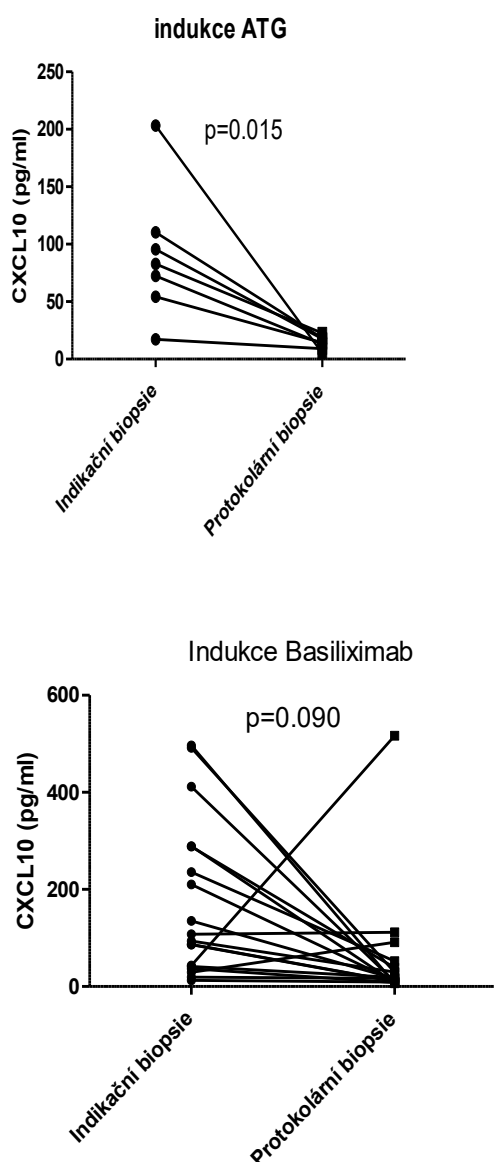
	Bez rejekce ($n = 16$)	S rejekcí ($n = 9$)	p
Věk příjemce (roky)*	58,6 [30,1, 71,3]	61,2 [44,1, 81]	0,164
Pohlaví příjemce, muži, n (%)	12 (75 %)	6 (66,7 %)	0,673
Retransplantace, n (%)	0 (0 %)	0 (0 %)	1
Žijící dárce n (%)	1 (6,3 %)	1 (11,1 %)	1
Věk dárce (roky)*	50,5 [24, 74]	67 [46, 80]	0,008
Pohlaví dárce, muži, n (%)	12 (75 %)	3 (33,3 %)	0,087
Dialýza (měsíce)*	28,8 [7,5, 91,2]	16,8 [0, 58,8]	0,269
Panel reaktivní protilátky (max)*	6 [0, 98]	8 [0, 38]	0,863
HLA neshoda*	4 [1, 6]	3 [0, 5]	0,488
Studená ischemie (hod)*	16,8 [1,5, 23]	15,9 [2,2, 19,8]	0,533
Opožděná funkce štěpu, n (%)	15 (93,8 %)	3 (33,3 %)	0,003
Depleční indukční léčba	5 (31,3 %)	2 (22,2 %)	1
Kreatinin v době biopsie (umol/l) *	526,3 [208,9, 820]	224,9 [177,1, 788,8]	0,190

* Data jsou prezentována jako medián [min, max]. Kategorické proměnné byly vyjádřeny počtem (n) a procenty.

Vzhledem k tomu, že v časném potransplantačním období, kdy je štěp poškozen ischemicko-reperfúzním poškozením, je aktivována imunitní odpověď a zvýšeny hladiny chemokinů, zajímalo nás, zda do 3. měsíce dochází k poklesu hladin chemokinů. Dle obrázku (obr. 15) vidíme pokles hladiny CXCL10 od diagnózy časných hraničních změn (v indikační biopsii) do tříměsíčních hraničních změn (v protokolární biopsii) po transplantaci ($p = 0,0018$). V časných hraničních změnách v období do 14 dnů po transplantaci neměla hladina chemokinů CXCL10 prediktivní roli pro rozvoj rejekce. Pouze u jedné pacientky byla hladina CXCL10 ve 3. měsíci vysoká a té byla ve 3. měsíci diagnostikována rejekce v protokolární biopsii.

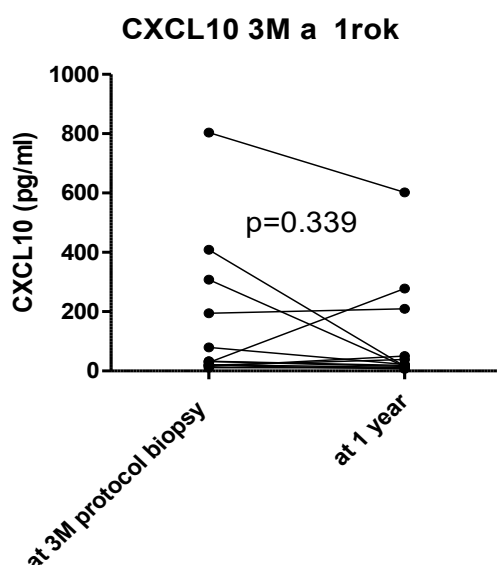


U indukce basiliximabem došlo také k poklesu u většiny pacientů, u dvou zůstala hladina stejná a u jedné pacientky došlo k významnému nárůstu ($p = 0,090$). K nárůstu došlo pouze u pacientky, která byla léčena basiliximabem a vykazovala vzrůst hladiny CXCL10 od indikační časné biopsie do protokolární biopsie, kde jí byla diagnostikována rejekce (obr. 16).



Obr. 16: Pacienti s léčbou ATG nebo Basiliximabem. Pokles hladiny CXCL10 od diagnózy časných hraničních změn do 3. měsíce, u indukce ATG ($p = 0,015$), u indukce basiliximabem ($p = 0,090$). Provedeno Wilcoxon-signed rank testem.

Dále nás také zajímalo, zda dojde k poklesu CXCL10 od tříměsíční protokolární biopsie s hraničními změnami do 1 roku po transplantaci. Koncentrace chemokinu v 1 roce se významně nemění, se statistickou hodnotou ($p = 0,339$) (obr. 17).



Obr. 17: Hladina CXCL10 ve 3M protokolárních změnách a v ročních změnách s $p = 0,339$. Wilcoxon-signed rank test.

5.3 Výsledky *IFN- γ* ELISPOT

V souboru 38 pacientů (příjemců), kteří měli diagnostikovány hraniční změny, bylo po této diagnóze 27 pacientů bez rejekce a 11 pacientů vyvinulo následně po hraničních změnách rejekci. Čtyři pacienti vyvinuli akutní TCMR IB, dva chronickou TCMR, čtyři pacienti chronickou ABMR a jeden akutní ABMR. Bohužel u dvou pacientů s rejekcí bylo málo buněk pro provedení ELISPOTu. Klinické a demografické údaje jsou popsány v tabulce (Tab. 5).

Pacienti, kteří po hraničních změnách vyvinuli rejekci, se od pacientů bez rejekce nelišili v základních klinických parametrech jako věk a pohlaví příjemce, pohlaví dárce, HLA mismatch, délka dialýzy a studená ischemie. Pacienti s rejekcí měli statisticky nevýznamně vyšší věk dárce ($p = 0,059$) a hladinu PRA ($p = 0,070$) a překvapivě nižší výskyt opožděné funkce štěpu 27,3 % vs. 70,4 % u skupiny bez rejekce ($p = 0,028$) (Tab. 5).

Tab. 5: Demografická charakteristika pacientů pro IFN- γ ELISPOT (n = 38). Spojité proměnné byly porovnány Mann-Whitney testem a kategorické proměnné chi-kvadrát testem.

	Bez rejekce (n = 27)	S rejekcí (n = 11)	p
Věk příjemce (roky)*	58,5 [30,1, 71,3]	63,4 [22,3, 76]	0,161
Pohlaví příjemce, muži, n (%)	18 (66,7 %)	4 (36,4 %)	0,471
Retransplantace, n (%)	5 (18,5 %)	1 (9,1 %)	0,514
Žijící dárce n (%)	0 (0 %)	0 (0 %)	1
Věk dárce (roky)*	52 [21, 71]	65 [36, 74]	0,059
Pohlaví dárce, muži, n (%)	18 (66,7 %)	6 (54,5 %)	0,712
Dialýza (měsíce)*	27,6 [7,5, 106,8]	26,4 [0, 58,8]	0,479
Panel reaktivní protilátky (max)*	8 [0, 98]	34[0, 98]	0,070
HLA neshoda*	3 [1, 6]	3 [0, 5]	0,417
Studená ischemie (hod)*	16,4 [3,1, 23]	15,6 [13,3, 20]	0,936
Opožděná funkce štěpu, n (%)	19 (70,4 %)	3 (27,3 %)	0,028
Depleční indukční léčba	14 (51,9 %)	6 (54,5 %)	1
Kreatinin v době biopsie (umol/l) *	461,8 [82,5, 953,3]	207 [81,8, 534,9]	0,171

* Data jsou prezentována jako medián [min, max]. Kategorické proměnné byly vyjádřeny počtem (n) a procenty.

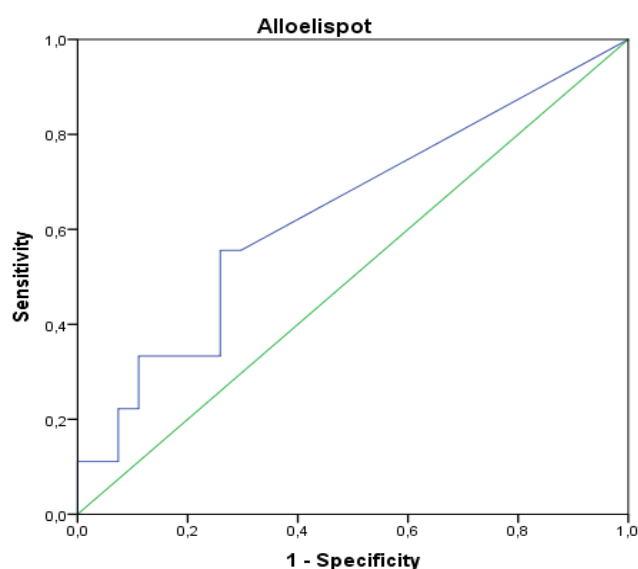
Detailní přehled výsledků ELISPOTu pro jednotlivé pacienty je uveden v (Tab. 6), včetně typu rejekce u pacientů, kteří po hraničních změnách vyvinuli rejekci (s rejekcí (1) nebo bez rejekce (0)). Byl změřen počet paměťových buněk produkujících IFN- γ po stimulaci buňkami dárce, cytomegalovirovými peptidy pp65 a IE-1 při biopsii a rok poté (Tab. 6). 4 pacienti s rejekcí z 11 (respektive z 9, u 2 pacientů ELISPOT neproveden) měli pozitivní ELISPOT v době biopsie (sensitivita 44 %) a 20 z 27 bez rejekce ho mělo negativní (74,1 % specificita). Schopnost IFN- γ ELISPOTu predikovat v době hraničních změn následný rozvoj rejekce je tedy nízká, jak potvrzuje i ROC analýza (p = 0,235, AUC = 0,634, obr. 18).

Tab. 6: Počet pacientů (n = 38) a počet spotů pro metodu IFN- γ ELISPOT, pp65, IE-1, allo při biopsii a 1 rok poté. Bez rejeckce 0, s rejeckí 1.

Pacienti	Den rejeckce, druh rejeckce, Typ indukční imunoprese	rejeckce	pp65 při biopsii	IE-1 při biopsii	allo při biopsii	pp65 1 rok poté	IE-1 1 rok poté	allo 1 rok poté
1		0	130,5	79	0	0	8	0
2		0	87,5	53,5	0	98,5	130,5	0
3		0	354,5	63,5	0	334	157	0
4		0	286	30	0	376	52	0
5	ATG	0	xxx	xxx	65	xxx	xxx	xxx
6		0	17,5	0	0	290,5	0	21
7		0	143,5	8,5	0	36	17	0
8	130 den, chronická ABMR, ATG	1	37	14	152	343,5	539,5	0
9	136 den, ATCMRIB, ATG	1	87	124	0	25	1	54
10	105 den, akutní ABMR, Simulect	1	40	37	0	304	13	0
11	101 den, ATCMRIB IB, Simulect	1	0	0	0	179,5	130,5	0
12		0	12	3	0	241	5	0
13	Simulect	0	196,5	8,5	31	8	2	0
14	90 den, chronická ABMR, Simulect	1	2	0	0	213	203	13
15		0	32	27	0	54	39	0
16		0	20	37	0	485,5	439,5	2
17		0	162	36	7	353	7	0
18	Simulect	0	0	0	51	2	0	9
19	638den, ATCMRIB	1	xxx	xxx	xxx	202	86	0
20		0	102,5	2,5	0	165,5	18,5	0
21	346 den, chronická ABMR, ATG PF, IVIG	1	1	0	23	1	0	78
22		0	69,5	29,5	0	279,5	328,5	0
23		0	5	2	0	xxx	xxx	xxx
24		0	31	133	0	27	37	0
25		0	8	17	0	69	40	0
26	121 den, ATCMRIB, Simulect	1	102	11,5	10	149,5	14	0
27		0	1	0	0	xxx	xxx	0
28	195 den, chronická	1	141	26	79	80	1	68

	TCMR, Simulect							
29	Simulect	0	168	72	121,4	457	25	0
30		0	9	22	0	267,5	11,5	0
31	Simulect	0	171,5	0	51	xxx	xxx	xxx
32		0	66	79	0	95	57	24
33	105 den, chronická ABMR, ATG, PE, IVIG	1	113	61	57	268	196	0
34	PE, IVIG, ATG	0	48	36	135	94	58	87
35		0	282	8	0	152	432	60
36	163 den, chron- ická TCMR	1	135,5	25,5	xxx	8,5	0	xxx
37	Simulect	0	10,5	1,5	56	441,5	148,5	7
38		0	257	297	0	459,5	339,5	0

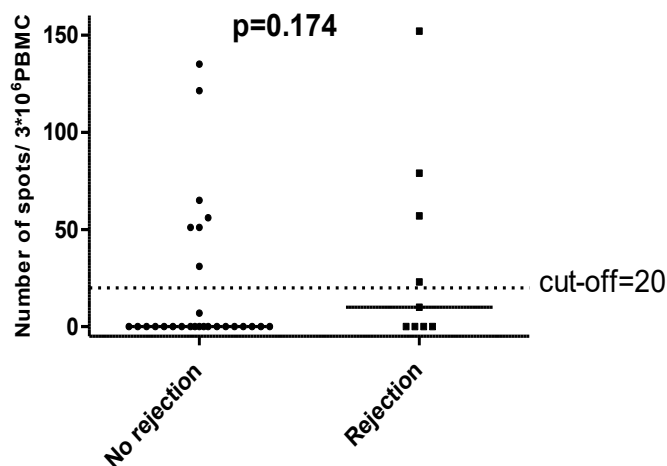
Níže je ROC křivka allo-ELISPOTu IFN- γ , se statistickou hodnotou $p = 0,235$ (obr. 18).



Obr. 18: Predikce rejekce po hraničních změnách na základě stanovení alloreakivity pomocí IFN- γ allo-ELISPOTu, ROC křivka, $p = 0,235$, $AUC = 0,634$.

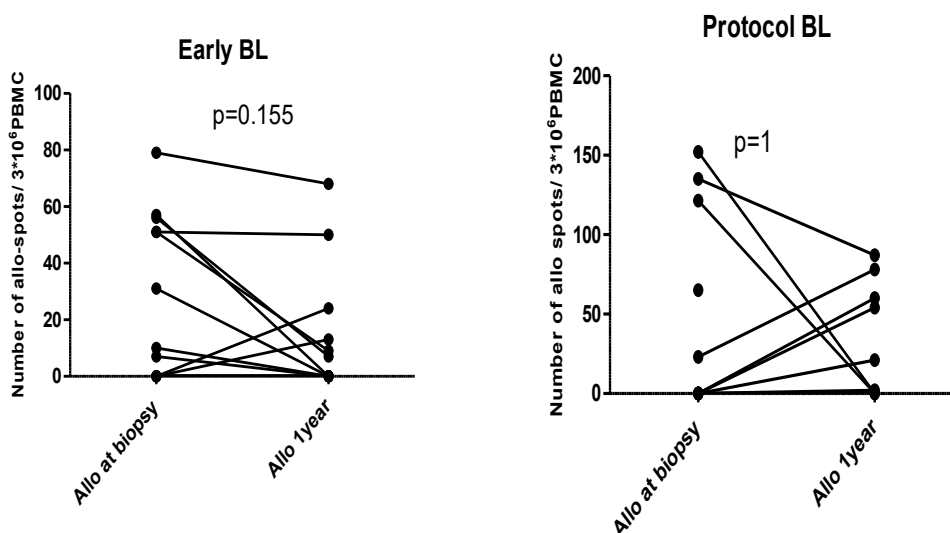
Rejekci nepredikuje ani počet IFN- γ produkujících buněk po stimulaci peptidy pp65 a IE-1 (ELISPOT) (ROC) (pp65: $p = 0,377$, $AUC = 0,404$. IE1: $p = 0,634$, $AUC = 0,448$).

Pacienti s rejekcí a bez rejekce se nelišili ani v počtu IFN- γ produkujících buněk na $3 \cdot 10^5$ PBMC (periferní krevní mononukleární buňky) ($p = 0,174$) (obr. 19).



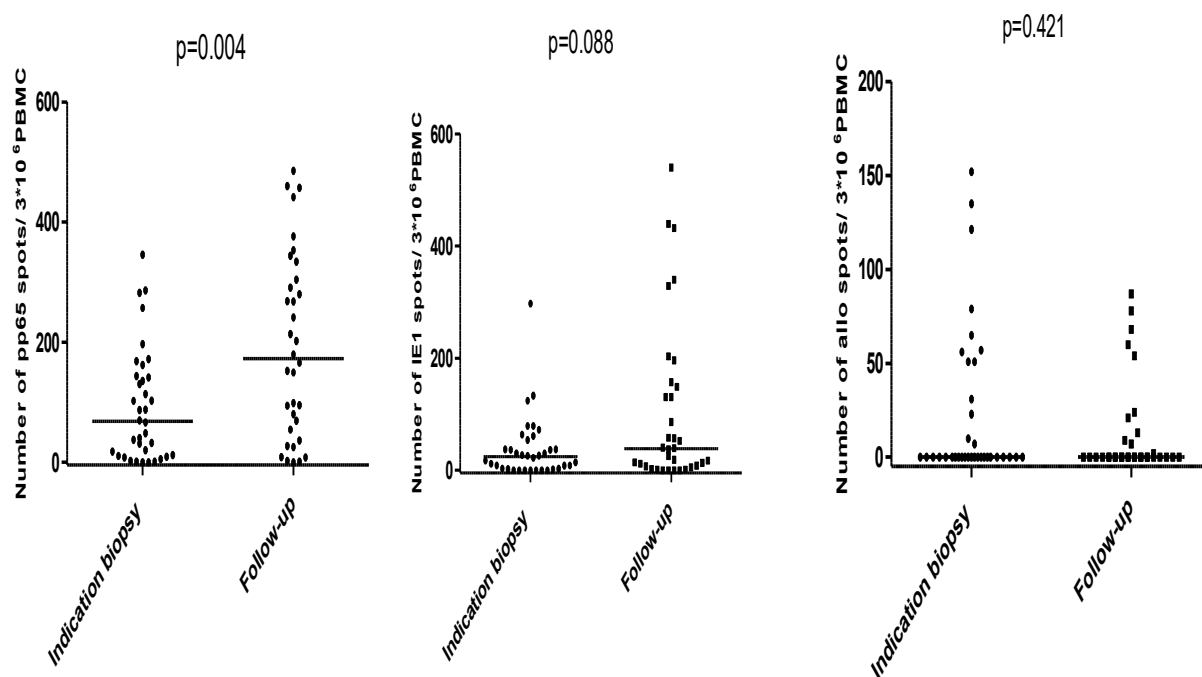
Obr. 19: IFN- γ allo-ELISPOT výsledky, $p = 0,174$, Mann Whitney test.

Dále nás zajímal vývoj alloreaktivity v průběhu 1 roku po diagnóze hraničních změn. Na obrázku (obr. 20) vidíme u časných hraničních změn (Early BL) pouze nepatrný pokles počtu buněk IFN- γ od biopsie do jednoho roku po transplantaci ($p = 0,155$). U 4 pacientů s pozitivním allo-ELISPOTem ze 7 v době časných hraničních změn došlo do 3. měsíce k poklesu, u 2 pacientů byl ve 3. měsíci podobný nález a u dalšího se objevila pozitivita ve 3. měsíci. Od diagnózy hraničních změn ve 3. měsíci (Protocol BL) došlo k poklesu alloreaktivity jen u 3 pacientů z 5 s pozitivní hodnotou ve 3. měsíci a u 4 došlo k nárůstu allo-ELISPOTu v roce $p = 1$.



Obr. 20: Porovnání IFN- γ allo-ELISPOTu v době biopsie s nálezem hraničních změn (buď v časné indikační biopsii nebo v protokolární biopsii) a s odstupem 1 roku od diagnózy. Počet allo-spot IFN- γ ($3 \cdot 10^6$) PBMC. Wilcoxon-signed rank test.

Kromě allostimulace nás zajímala i přítomnost CMV reaktivních efektorových/paměťových buněk v době diagnózy hraničních změn a rok poté. Počet CMV reaktivních efektorových/paměťových buněk od doby diagnózy do 1 roku významně vzrostl (po stimulaci pp65 ($p = 0,004$) a po stimulaci IE-1 ($p = 0,088$). Naproti tomu významný nárůst nebyl pozorován u alloreaktivních efektorových/paměťových buněk ($p = 0,421$) při biopsii a v ročním follow-up (obr. 21).



Obr. 21: Počet IFN- γ produkujících buněk po stimulaci CMV peptidy (IE1 a pp65) a po allostimulaci CD2 depletovanými splenocyty dárce v časné indikační biopsii a 1 rok po transplantaci. Rozdíly byly stanoveny Wilcoxon-signed rank testem.

6 Diskuze

Hraniční změny představují častý histologický nález ledvinných štěpů a jsou definované Banffskou klasifikací jako předstupeň do T buňkami zprostředkované rejekce (Loupy et al. 2017). Přestože podle molekulárního fenotypu má jen 30 % pacientů s hraničními změnami rejekční charakter (de Freitas et al. 2012), tak většina center pacienty léčí steroidy. Léčba steroidy má řadu nežádoucích účinků, proto by bylo ideální u pacientů s nízkým rizikem vzniku rejekce léčbu minimalizovat. Avšak u pacientů s vysokým rizikem vzniku rejekce je imunosupresivní léčba žádoucí, nedodržením léčby by byl stav pacienta ohrožen, mohlo by dojít až k selhání transplantátu.

Abychom správně určili, u kterých pacientů s hraničními změnami dojde k následné progresi do rejekce, je třeba vyvinout další diagnostické nástroje a najít biomarkery (ideálně neinvazivní), pomocí kterých je budeme schopni identifikovat s vysokou sensitivitou a specificitou. Imunitní stav pacientů je rutinně v laboratořích IKEM monitorován před transplantací řadou metod jako stanovením hladiny panel reaktivních protilátek (PRA) metodikou CDC (Komplement-dependentní mikrolymfocytotoxický test), vyšetřením anti-HLA protilátek metodikou Luminex, cytotoxickým cross-match testem a hodnocením T a B crossmatch pomocí průtokové cytometrie. Po transplantaci lékaři pacientům kontrolují hladinu kreatininu ze séra, jehož zvýšení je ukazatelem zhoršené renální funkce. V případě zhoršené funkce štěpu lékař indikuje biopsii, případně vyšetření donor specifických protilátek. Podle výsledku biopsie je pak nastavena případná léčba. Měření cytokinového profilu se rutinně u pacientů neprovádí, neboť funkce cytokinů se překrývají a chybí jednotná optimalizace výsledků.

Diplomová práce je součástí grantu Molekulární a imunologická charakterizace hraničních změn ledvinných štěpů. Analýza transkriptomu pomocí microarrays ukázala vyšší imunitní aktivaci u těch hraničních změn, které jsou diagnostikovány v časném potransplantačním období Hruha et al. (2015) a v biopsiích s časnými hraničními změnami, které progredují do rejekce, byla zjištěna vyšší exprese prozánětlivých chemokinů. Proto jsme vybrali prozánětlivé chemokiny CXCL9, CXCL10 a CCL17 a ověřovali jejich potenciální predikční schopnost jako neinvazivních biomarkerů rejekce. Dále jsme se zaměřili na buňky produkující prozánětlivý cytokin IFN- γ , po stimulaci buňkami dárce, které jsme měřili IFN- γ ELISPOTem. Dosud prováděné studie stanovovaly dárcovsky specifickou alloimunitu pomocí ELISPOT v době před transplantací nebo prospektivně v daných časových intervalech (Nickel et al. 2004,

Augustine et al. 2008, Reinsmoen et al. 2008, Crespo et al. 2015, Hricik et al. 2015, Slavcev et al. 2015, Montero et al. 2019, Stranavova et al. 2019). My jako první jsme ho stanovili v době diagnózy hraničních změn.

Řada studií se zabývala predikční schopností chemokinů CXCL10 a CXCL9 v moči pacientů před transplantací, či v různém období po transplantaci pro vznik akutní rejekce nebo na selhání štěpu. Některé studie uvádějí, že CXCL10 nebo CXCL9 v moči před transplantací predikuje pozdější selhání štěpu (Lazzeri et al. 2005) nebo akutní rejekci (Hu et al. 2004, Jackson et al. 2011). Jiné studie uvádějí, že hladina CXCL10 před transplantací se neliší u pacientů se stabilní funkcí a těmi s rejekcí (Heidt et al. 2011, Field et al. 2014, Ciftci et al. 2019). Autoři uvádějí, že predikční schopnost je ovlivněna podáním indukční depleční léčby po transplantaci (rATG), takže dojde k depleci buněk reagujících na CXCL10 a CXCL9. V případě indukční léčby basiliximabem nedojde k depleci lymfocytů, ale je narušena aktivace T buněk bloádou anti CD25 (α řetězec receptoru pro IL2). S těmito autory se shodují i naše zjištění, že v době hraničních změn v období prvních 14 dní po transplantaci byla hladina chemokinů CXCL10 i CXCL9 zvýšená téměř u všech pacientů a v časném období po transplantaci je nelze použít k predikci rejekce, tudíž ani k predikci přežití funkce štěpu.

Nicméně Field et al. (2014) zjistili u kohorty 94 pacientů s pozitivními DSA, že již první den po transplantaci může vysoká hladina CXCL10 predikovat vznik rejekce (AUC = 0,73, $p < 0.001$). Další studie se zabývaly predikční schopností těchto chemokinů v období 1. – 3. měsíce po transplantaci (Rabant et al. 2016, Ciftci et al. 2019). V první studii bylo sledováno v prvním potransplantačním roce 300 příjemců ledviny, u pacientů s akutní rejekcí byla koncentrace chemokinů zvýšena v 1. měsíci ($p = 0,0005$) a ve 3. měsíci ($p = 0,0009$) (Rabant et al. 2016). V druhé studii bylo zahrnuto 490 vzorků moče po transplantaci od 75 příjemců ledviny, 115 vzorků s rejekcí a 325 bez rejekce. Nebyl zjištěn žádný významný rozdíl v předoperačních hladinách CXCL9 a CXCL10, hladiny CXCL9 i CXCL10 v moči byly u pacientů s rejekcí významně vyšší ve srovnání se skupinou bez rejekce 1. den, 7. den a 1. měsíc po transplantaci ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p = 0,002$). Byla detekována vyšší střední hodnota CXCL9 u pacientů s rejekcí zprostředkovanou T lymfocyty 175,12 ng/ml, pro CXCL10 nejvyšší střední hodnota byla 258,12 ng/ml. Sensitivita a specificita testu pro CXCL10 v 1. měsíci po transplantaci pro predikci rejekce byla 65 % a 86 % (Ciftci et al. 2019). Také ve studii Hricik et al. (2013) autoři analyzovali CXCL9 z moče 280 pacientů a u pacientů s histologicky diagnostikovanou akutní rejekcí pozorovali

zvýšené koncentrace CXCL9 už 30 dní před klinickou diagnózou dysfunkce štěpu. Hodnoty CXCL9 v moči klesly do 30 dnů po léčbě, předtransplantační hladiny CXCL10 se zvýšily a zůstaly stejně vysoké v době rejekce (Hricik et al. 2013). U našeho souboru jsme zaznamenali patrný pokles hladiny CXCL10 od diagnózy časných hraničních změn do 3. měsíce ($p = 0,0018$) zřejmě v důsledku indukční léčby a podání pulsu steroidů, ale už ne od 3. měsíce do 1 roku od diagnózy.

V porovnání s těmito autory jsme zaznamenali podobné výsledky pro CXCL10, kde jeho vyšší hladina u subklinických hraničních změn ve 3. měsíci predikovala rejekci po hraničních změnách ve 3. měsíci s 77,8 % sensitivitou a 77,4 % specificitou ($AUC = 0,749$, $p = 0,024$ při cut-off = 57,79). Vyšší hladinu chemokinů CXCL9 u pacientů s progresí do rejekce jsme nepotvrdili ($p = 0,935$).

Jackson et al. (2011) zjistili vyšší hladinu chemokinů CXCL9 a CXCL10 ($p = 0,002$) u pacientů s akutní rejekcí, ale i s BKV infekcí. To je v souladu s našimi výsledky, kdy vysoká hladina CXCL10 byla zjištěna také u pacientů s probíhající BKV infekcí. CXCL10 není markerem jen rejekce, ale i infekce ($AUC = 0.86$, $p < 0,001$), u CXCL9 jsme tento vztah narozdíl od tohoto autora nepotvrdili.

CXCL10 v moči je nadějným neinvazivním biomarkerem rizika rozvoje rejekce po subklinických hraničních změnách ve 3. měsíci. CXCL10 je nejenom markerem rizika rozvoje rejekce, ale může být ukazatelem aktuálně probíhající močové infekce. U diagnózy hraničních změn v časném potransplantačním období ho však jako biomarker použít nelze.

Jako další potenciální biomarker byl prozánětlivý cytokin IFN- γ . Pro identifikaci pacientů s hraničními změnami s rizikem progresu do následné rejekce jsme testovali alloreaktivitu v době diagnózy hraničních změn pomocí IFN- γ ELISPOTu ($n = 38$). Nicméně, schopnost IFN- γ ELISPOTu predikovat v době hraničních změn následný rozvoj rejekce byla nízká ($p = 0,235$, $AUC = 0,634$). 4 pacienti s rejekcí z 11 (respektive z 9, protože u 2 nebyl výsledek k dispozici) měli pozitivní allo-ELISPOT v době biopsie (sensitivita 44 %) a 20 z 27 bez rejekce ho mělo negativní (74 % specificita). Protože 20 pacientů (53 %) z našeho souboru dostalo indukční léčbu Thymoglobulinem, což může ovlivnit rozvoj následné rejekce, rozdělili jsme soubor ještě na pacienty s časnou diagnózou hraničních změn v období brzy po transplantaci

a na pacienty, u nichž byly diagnostikovány hraniční změny ve 3. měsíci, kdy už je efekt indukční léčby méně patrný.

U 14 pacientů byl ELISPOT proveden při diagnóze hraničních změn v tříměsíční protokolární biopsii (jednalo se tedy o subklinické hraniční změny bez zhoršení renální funkce) a 13 ze 14 těchto pacientů mělo depleční indukční léčbu Thymoglobulinem a pouze 1 pacient měl Basiliximab. ELISPOT byl pozitivní u 3 z 10 pacientů bez následné rejekce a u 2 ze 4 s následným rozvojem rejekce (u 1 pacienta s rejekcí nebyl výsledek ELISPOTu k dispozici). U protokolárních biopsií byla tedy sensitivita testu 67 % a specifická 70 % ($AUC = 0,683$; $p = 0,353$) a výsledek je tedy nesignifikantní. Dále byl ELISPOT proveden u 24 pacientů s diagnózou v časném potransplantačním období (medián 7 dní [min 6, max 23]) a u této skupiny mělo 7 pacientů (29 %) depleční indukční léčbu Thymoglobulinem. Ze 17 pacientů bez progresu do rejekce po časných hraničních změnách mělo 13 pacientů negativní a 4 pozitivní allo-ELISPOT (specifická 76 %) a ze 7 pacientů s rejekcí měli pozitivní allo-ELISPOT 2 (u 1 výsledku není k dispozici) (sensitivita 33 %). I v tomto případě byla prediktivní schopnost testu nesignifikantní ($AUC = 0,637$; $p = 0,350$). Ze 7 pacientů s indukcí ATG byl pozitivní allo-ELISPOT v časném období po transplantaci pouze u 1 pacientky, u této pacientky došlo k rozvoji chronické protilátkami zprostředkované rejekce ve 3. měsíci.

IFN- γ ELISPOT v době diagnózy hraničních změn podle našich výsledků tedy nemá prediktivní funkci pro následný vznik rejekce.

Řada studií se zabývala korelací allo-ELISPOTu v době před transplantací, či po transplantaci a rozvojem rejekce v různém časovém rozmezí po transplantaci. První malá pilotní studie z roku 1999 Heeger et al. (1999), která hodnotila počet donor-specifických IFN- γ produkujících buněk metodou ELISPOT uvádí, že 7 z 9 pacientů s pozitivním ELISPOTem vyvinulo akutní rejekci, zatímco s negativním ELISPOTem nikdo z pacientů neměl akutní rejekci. Studie Nickel et al. (2004) na 42 pacientech prokázala vyšší frekvence alloreaktivních buněk před transplantací u pacientů s akutní rejekcí. Pacienti s vysoce alloreaktivními buňkami před transplantací (> 200 spotů/300,000 PBMC, $n = 5/42$) měli největší riziko závažné akutní rejekce. V další studii Augustine et al. (2005) na kohortě 100 příjemců ledviny prokázali pozitivní předtransplantační ELISPOT u 38 % pacientů s akutní rejekcí a jen u 14 % pacientů negativní ELISPOT ($p = 0,008$). Ve studii Crespo et al. (2015) autoři zkoumali prediktivní schopnost allo-ELISPOTu IFN- γ v době před transplantací u 90 pacientů na výskyt časně

akutní rejekce. V této studii pozitivní allo-ELISPOT před transplantací predikoval následnou TCMR v období prvních dvou měsíců po transplantaci ($AUC = 0,701$, $p = 0,065$), ale už ne rejekci do 1 roka (Crespo et al. 2015). V této studii jen málo pacientů dostalo T depleční indukční léčbu Thymoglobulinem (29 %), narozdíl od naší kohorty, kde takových pacientů bylo 53 %. Thymoglobulin snižuje subpopulace T lymfocytů až do doby 3M po transplantaci Krepsova et al. (2015) a jeho podání tak může zabránit rozvoje rejekce u pacientů s pozitivním allo-ELISPOTem před transplantací (Cherkassky et al. 2011). Asociace předtransplantační alloreakivity s časnou rejekcí byla ve studii Crespo et al. (2015) nejsilnější u mladých příjemců ledviny, kteří neměli léčbu Thymoglobulinem. Jiná studie Hricik et al. (2013) se zabývala asociací předtransplantační alloreakivity a rejekcí v rozmezí 1 roku po transplantaci u 118 pacientů a ukázala vyšší riziko rejekce u pacientů s pozitivním allo-ELISPOTem ($OR = 3,6$, $p = 0,009$). Nicméně sensitivita testu byla pouze 56 % a specifická 86 %. V této studii mělo indukční léčbu 48 % pacientů.

V další studii se autoři zaměřili na prediktivní schopnost allo-ELISPOTu IFN- γ v době 6M protokolární biopsie na výskyt subklinické TCMR v 6M (Crespo et al. 2017). Pozitivní allo-ELISPOT v době šestiměsíční protokolární biopsie predikoval subklinickou TCMR s $AUC = 0,800$, se sensitivitou 82 % a specifitou 88 % při cut-off 19 spotů na 300 tisíc PBMC na kohortě 60 pacientů a výsledky validovali na 101 dalších pacientech ($AUC = 0,725$ se sensitivitou 80 % a specifitou 64 %, $p = 0,006$) (Crespo et al. 2017).

Některé studie ale neprokázaly souvislost mezi pozitivním allo-ELISPOTem před transplantací a výskytem rejekce (Augustine et al. 2008, Hricik et al. 2015, Slavcev et al. 2015, Stranavova et al. 2019). Pozitivita IFN- γ ELISPOTu v době před transplantací (176 pacientů) nekorelovala ani s výskytem akutní rejekce a ani s renální funkcí v 6. a 12. měsíci po transplantaci. V této studii korelovala horší renální funkce s pozitivním allo-ELISPOTem pouze u pacientů bez indukční léčby ATG. Tyto práce vysvětlují, že výsledky jsou zkresleny podáním indukční léčby ATG pacientům, a tedy eliminací paměťových T buněk (Reinsmoen et al. 2008, Augustine et al. 2008). V další studii nebyl nalezen vztah mezi předtransplantačním allo-ELISPOTem a incidencí akutní rejekce. Nicméně zjistili korelaci mezi frekvencí IFN- γ produkujících buněk a mírou HLA neshody ($p < 0,01$). Tři pacienti ze 6 s akutní TCMR do 1. měsíce, kteří měli indukční léčbu ATG, měli 10x vyšší frekvenci buněk produkujících IFN- γ než pacienti se stejnou indukční léčbou ale bez rejekce (Slavcev et al. 2015).

Recentně byla provedena meta-analýza asociace mezi předtransplantačním IFN- γ ELISPOTem a akutní rejekcí (Montero et al. 2019). Do studie bylo zahrnuto 1181 pacientů z 12ti studií. ELISPOT IFN- γ byl významně spojen se zvýšeným rizikem AR (OR = 3,29, 95 % CI = 2,34 – 4,60); odhadované hodnoty sensitivity a specificity byly však pouze 64,9 % a 65,8 %. Autoři vyvozují, že IFN- γ ELISPOT je sice významně spojen se zvýšeným rizikem akutní rejekce, ale jeho prediktivní schopnost jako biomarkeru je nedostatečná (Montero et al. 2019). Nevýhodou meta-analýz je ale spojení výsledků studií, které nejsou metodologicky zcela stejné, používají různé definice pro stanovení thresholdu pro pozitivní allo-ELISPOT, různé definice pro rejekci a také různá časová rozmezí, v kterém byla rejekce hodnocena.

V naší studii jsme se snažili stanovit prediktivní schopnost IFN- γ allo-ELISPOTu pro následný rozvoj rejekce po diagnóze hraničních změn. Naše výsledky prediktivní schopnost allo-ELISPOTu neprokázaly. Je pravděpodobné, že u podskupiny hraničních změn v prvních 2 týdnech po transplantaci může být výsledek zkreslen u pacientů s léčbou, která depletuje T lymfocyty. U skupiny subklinických hraničních změn ve 3. měsíci by efekt Thymoglobulinu měl být daleko menší. Bohužel v této skupině bylo pouze 14 pacientů a z nich jen 4 vyvinuli rejekci, tedy statistická analýza je limitována malou velikostí vzorku. Naše studie se od předešlých lišila tím, že jsme allo-ELISPOT stanovovali v době diagnózy hraničních změn, které jsou považovány za nález budící podezření na T buňkami zprostředkovanou rejekci a předpokládali jsme, že vyšší alloreaktivita by mohla být biomarkerem následné progresu do rejekce. Pozitivní allo-ELISPOT by mohli mít také ti pacienti s hraničními změnami, jejichž molekulární fenotyp má rejekční charakter (de Freitas et al. 2012). Pacientů s pozitivním ELISPOTem bylo 11 z 38 (29 %), což odpovídá podílu pacientů s rejekčním molekulárním fenotypem.

Kromě vlivu počtu allo-specifických lymfocytů na vznik rejekce nás také zajímalo, zdali CMV-specifické efektorové/paměťové T lymfocyty měřené v době stanovení diagnózy hraničních změn mají vliv na vznik rejekce. Ve studii Stranavova et al. (2019) autoři zjistili, že pacienti, kteří měli před transplantací vyšší výskyt CMV specifických T lymfocytů měřených pomocí ELISPOTu (IE-1 antigen), měli vyšší pravděpodobnost vzniku rejekce a také horší renální funkci ve 3., 6., a 12. měsíci. Autoři tuto asociaci mezi rejekcí a CMV specifickými T lymfocyty vysvětlili existencí heterologní imunity, tj. zkřížené reakce mezi CMV a allo-specifickými T lymfocyty. V naší studii počet CMV-

specifických T lymfocytů v době diagnózy hraničních změn následnou rejekci nepredikoval (pp65: AUC = 0,404; p = 0,377 a IE1: AUC = 0,448; p = 0,634). Imunitní systém pacientů po transplantaci je ovlivněn imunosupresivní léčbou. V naší testované kohortě pacientů bylo 20 z 38 (53 %) léčených depleční indukční imunosupresivní léčbou, která mohla ovlivnit frekvenci detekovatelných CMV specifických buněk v periférii.

Dále jsme zjistili, že počet CMV specifických T lymfocytů ve 12. měsíci byl výrazně vyšší (p = 0.004) než v době indikační biopsie. Naše zjištění odpovídají kinetice T buněčné rekonstituce po depleční imunoterapii, kdy nejdříve v časném období po transplantaci dochází ke snížení frekvence T lymfocytů pravděpodobně vlivem depleční léčby, ale později postupně dochází k obnově T buněčného repertoáru (Abate et al. 2010, Bae et al. 2018). Naše výsledky jsou v souladu s ostatními studiemi, Abate et al. (2010) ukázali, že v časném potransplantačním období (30 - 60 dní) dochází nejdříve k výraznému poklesu CMV specifických buněk u CMV seropozitivních pacientů, v pozdějším období po transplantaci (180 - 360 dnů) pak ale dochází k postupnému obnovení CMV specifických buněk. Tato zjištění potvrdila i práce Stranavova et al. (2018), ve které na kohortě 24 séropozitivních příjemců byla frekvence CMV specifických buněk (IE-1, pp65) již šest měsíců po transplantaci stejná jako v předtransplantačním období před nasazením imunosuprese.

Na potransplantační rekonstituci T lymfocytů může mít kromě jiných faktorů také vliv i homeostatická proliferace, kde lokální cytokinové prostředí může napomoci jak k proliferaci již existujících paměťových buněk, tak i ke konverzi reziduálních naivních T lymfocytů do paměťového fenotypu (Goldrath et al. 2000). Dalším důvodem nárůstu CMV specifických buněk v pozdějším období po transplantaci může být také potransplantační CMV reaktivace (Havenith et al. 2012). V našem transplantačním centru se u pacientů s depleční imunosupresí prvních 100 dní podává také profylaktická léčba valgancyklovirem, který brání případnému vzniku CMV DNAemie a CMV onemocnění. V pozdějším období po transplantaci, po vysazení profylaktické léčby může vlivem subklinických i klinických CMV reaktivací docházet ke zvyšování frekvence CMV specifických T lymfocytů (Fischer 2009, Humar et al. 2010, Selvey et al. 2017).

IFN- γ ELISPOT v době diagnózy hraničních změn podle našich výsledků tedy nemá prediktivní funkci pro následný vznik rejekce. Náš výzkum byl limitován malou kohortou pacientů (n = 38), dále pacienti s hraničními změnami jsou často léčeni po transplantaci

indukční léčbou ATG, tudíž je složité určit prediktivní schopnost IFN- γ ELISPOTu k rejekci. Nepodařilo se nám prokázat ani souvislost mezi frekvencí buněk produkujících IFN- γ po stimulaci CMV peptidy pp65 a IE-1 na následný rozvoj rejekce.

7 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na hledání neinvazivních biomarkerů následné rejekce štěpu ledviny po diagnóze hraničních změn stanovením vybraných chemokinů v moči/séru pacienta (CXCL9, CXCL10 a CCL17) a stanovením počtu alloreaktivních buněk v době diagnózy hraničních změn pomocí metody ELISA a IFN- γ ELISPOTu.

1. Nepodařilo se nám prokázat souvislost mezi frekvencí buněk produkujících IFN- γ po stimulaci buňkami dárce ani CMV peptidy a následným rozvojem rejekce.
2. V době diagnózy hraničních změn v období prvních 14 dní po transplantaci byla hladina chemokinů CXCL10 i CXCL9 zvýšená téměř u všech pacientů a v časném období po transplantaci je nelze použít k predikci rejekce. Nicméně, u subklinických hraničních změn ve 3. měsíci vyšší hladina chemokinů CXCL10 predikovala rejekci ($p = 0,024$) se sensitivitou 77,8 % a specificitou 77,4 %. Vysoká hladina CXCL10 byla zjištěna také u pacientů s BKV infekcí. U chemokinů CXCL9 a CCL17 jsme však vztah k rejekci nepotvrdili.

Doporučení pro klinickou praxi, vyplývající z našich výsledků. CXCL10 v moči je nadějným neinvazivním biomarkerem rizika rozvoje rejekce po subklinických hraničních změnách ve 3. měsíci. CXCL10 je nejenom markerem rizika rozvoje rejekce, ale může být ukazatelem aktuálně probíhající močové infekce. Stanovení CXCL10 v moči pacienta s diagnózou hraničních změn ve 3. měsíci by pomohlo identifikovat pacienty v riziku a zahájit u nich pečlivé sledování a adekvátní léčbu.

8 Seznam obrázků a tabulek

Obr. 1: Struktura molekul HLA 1. a 2. třídy. Převzato z: http://www.gjtmonline.com/viewimage.asp?img=GlobJTransfusMed_2017_2_2_77_214287_f1.jpg.

Obr. 2: Způsoby rozpoznávání alloantigenu u orgánových transplantací. Převzato z: Siu, J.H.Y., Surendrakumar, V., Richards, J.A., Pettigrew, G.J. (2018): T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. Front. Immunol. 9: 2548.

Obr. 3: Hyperakutní, akutní a chronická rejekce. Převzato z: <https://www.memorangapp.com/flashcards/106767/Week+9++Transplant+immunology/>.

Obr. 4: Anti-HLA protilátky vyvolávají chronickou rejekci pomocí Fc receptoru nebo komplementovou kaskádou a aktivují endoteliální buňky EC. Převzato z: <https://cjasn.asnjournals.org/content/13/1/182.figures-only>.

Obr. 5: Hraniční změny. Převzato z: www.pathologyoutlines.com/topic/kidneybanff.html.

Obr. 6: Typy interferonů (I, II, III. třídy) a jejich receptory. Převzato z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Chicken-interferons%2C-their-receptors-and-genes.-Goossens-Ward/376ed5766c9c827d3e5a9fb9671475840f4a1707/figure/0>.

Obr. 7: Struktury chemokinových tříd CC, CXC, CX₃C a C. Převzato z: <https://epomedicine.com/medical-students/chemokines-mnemonics/>.

Obr. 8: Zařazování pacientů (n počet) do studie pro metodu ELISPOT.

Obr. 9: Vrstvy jsou prezentovány ve zkumavce. Převzato z: <https://www.novusbio.com/antibody-news/isolating-immune-cells-from-peripheral-blood-how-and-when-to-use-density-gradient-centrifugation>.

Obr. 10: Pipetovací schéma destičky ELISPOTU.

Obr. 11: Srovnání chemokinů CXCL10 ($p = 0,026$), CXCL9 ($p = 0,935$) a CCL17 ($p = 0,213$). Mann Whitney test.

Obr. 12: CXCL10 v moči pacientů s BL ve 3M ($n = 40$) predikuje rozvoj TCMR, A. ROC analýza, B. Kaplan-Meier rejection-free interval.

Obr. 13: CXCL10 nespecifický marker rejekce i infekce, ROC křivka.

Obr. 14: Schéma pro rozlišení rejekce od infekčního onemocnění (nefropatie).

Obr. 15: Pokles hladiny CXCL10 od diagnózy časných hraničních změn do 3. měsíce ($p = 0,0018$).

Obr. 16: Pacienti s léčbou ATG nebo Basiliximabem. Pokles hladiny CXCL10 od diagnózy časných hraničních změn do 3. měsíce.

Obr. 17: Hladina CXCL10 ve 3M protokolárních změnách a v ročních změnách a $p = 0,339$.

Obr. 18: Predikce rejekce po hraničních změnách na základě stanovení alloreakivity pomocí IFN- γ allo-ELISPOTu, ROC křivka, $p = 0,235$, $AUC = 0,634$.

Obr. 19: IFN- γ allo-ELISPOT výsledky, $p = 0,174$, Mann Whitney test.

Obr. 20: Porovnání IFN- γ allo-ELISPOTu v době biopsie s nálezem hraničních změn (buď v časné indikační biopsii nebo v protokolární biopsii) a s odstupem 1 roku od diagnózy.

Obr. 21: Počet IFN- γ produkujících buněk po stimulaci CMV peptidy (IE1 a pp65) a po allostimulaci CD2 depletovanými splenocyty dárce v časné indikační biopsii a 1 rok po transplantaci.

Tab. 1: Banffská klasifikace dysfunkce transplantované ledviny (z roku 2015). Převzato a upraveno podle: Loupy, A., Haas, M., Solez, K. et al. (2017): The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. American Journal of Transplantation. 17(1), 28-41.

Tab. 2: Demografická charakteristika pacientů s hraničními změnami v tříměsíční protokolární biopsii ($n = 40$).

Tab. 3: Porovnání kreatininu s chemokiny CXCL10 a CXCL9 u pacientů s rejekcí do 1 roka a s pozitivní BKV PCR ve 3M.

Tab. 4: Demografická charakteristika pacientů s hraničními změnami v časné indikační biopsii ($n = 25$).

Tab. 5: Demografická charakteristika pacientů pro IFN- γ ELISPOT ($n = 38$).

Tab. 6: Seznam pacientů a počet spotů pro metodiku IFN- γ ELISPOT, pp65, IE1, allo při biopsii a 1 rok poté. Bez rejekce 0, s rejekcí 1.

9 Literatura

Abate, D., Saldan, A., Fison, M., Cofano, S., Paciolla, A., Furian, L., Ekser, B., et al. (2010): Evaluation of Cytomegalovirus (CMV)–Specific T Cell Immune Reconstitution Revealed That Baseline Antiviral Immunity, Prophylaxis, or Preemptive Therapy but not Antithymocyte Globulin Treatment Contribute to CMV-Specific T Cell Reconstitution in Kidney Transplant Recipients. *The Journal of Infectious Diseases*. 202(4), 585-594

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. (2003): *Cytokines. Cellular and Molecular Immunology*. 5th Edition. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science. pp. 243-74

Abou-Ayache, R., Bucher, M., Lepogamp, P., Westeel, P.F., Le Meur, Y., Etienne, I., Lobbedez, T., Toupance, O., Caillard, S., et al. (2008): CMV infections after two doses of daclizumab versus thymoglobulin in renal transplant patients receiving mycophenolate mofetil, steroids and delayed cyclosporine A. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 23(6), 2024-2032

Adu, D., Cockwell, P., Ives, N.J., et al. (2003): Interleukin-2 receptor monoclonal antibodies in renal transplantation: meta-analysis of randomised trials. *BMJ*. 326, 789-793

Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R.I., Lord, G.M. (2007): The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin. Exp. Immunol*. 148(1), 32-46

Ashoor, I., Najafian, N., Korin, Y., Reed, E.F., Mohanakumar, T., Ikle, D., Heeger, P.S., Lin, M. (2013): Standardization and cross validation of alloreactive IFN- γ ELISPOT assays within the clinical trials in organ transplantation consortium. *Am J Transplant*. 13, 1871-9

Augustine, J.J., Siu, D.S., Clemente, M.J., Schulak, J.A., Heeger, P.S., Hricik, D.E. (2005): Pre-transplant IFN-gamma ELISPOTs are associated with post-transplant renal function in African American renal transplant recipients. *Am. J Transplant*. 5: 1971-1975.

Augustine, J.J. Poggio, E.D., Heeger, P.S., Hricik, D.E. (2008): Preferential benefit of antibody induction therapy in kidney recipients with high pretransplant frequencies of donor-reactive interferon-gamma enzyme-linked immunosorbent spots. *Transplantation*. 86: 529-534.

Azzawi, M., Hasleton, P.S., Geraghty, P.J., Yonan, N., Krysiak, P., El-Gammal, A., et al. (1998): RANTES chemokine expression is related to acute cardiac cellular rejection and infiltration by CD45RO T-lymphocytes and macrophages. *J Heart Lung Transplant*. 17: 881-7.

Bae, S., Jung, J., Kim, S.M., et al. (2018): The Detailed Kinetics of Cytomegalovirus-specific T cell Responses after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: 1 Year Follow-up Data. *Immune Network*. 18 (2): 585-594.

Barber, D.L., Wherry, E.J., Ahmed, R. (2003): Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells. *J Immunol*. 171(1): 27-31.

- Barocci, S., Valente, U., Nocera, A. (2007): Detection and analysis of HLA class I and class II specific alloantibodies in the sera of dialysis patients awaiting for renal retransplantation. *Clin Transplant*. 21: 47-6.
- Bate, S.L., Dollard, S.C., Cannon, M.J. (2010): Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin Infect Dis*. 50(11): 1439-47.
- Belperio, J.A., Ardehali, A. (2008): Chemokines and transplant vasculopathy. *Circ Res*. 103(5): 454-66.
- Bestard, O., Lucia, M., Crespo, E., Van Liempt, B., Palacio, D., Melilli, E., Torras, J., Llaudo, I., Cerezo, G., Taco, O., Gil-Vernet, S., Grinyo, J.M., Cruzado, J.M. (2013): Pretransplant immediately early-1-specific T cell responses provide protection for CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 13: 1793-1805.
- Billottet, C., Quemener, C., Bikfalvi, A. (2013): CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1836: 287-295.
- Brennan, D.C., Daller, J.A., Lake, K.D., et al. (2006): Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med*. 355: 1967-1977.
- Cardoni, R.L., Prigoshin, N., Tambutti, M.L., Ferraris, J.R. (2005): Regulatory cytokines in the response to the allogeneic renal transplant. *Medicina*. 65: 54-62.
- Castellano, G., Melchiorre, R., Loverre, A., Ditunno, P., Montinaro, V., et al. (2010): Therapeutic targeting of classical and lectin pathways of complement protects from ischemia-reperfusion-induced renal damage. *Am J Pathol*. 176(4): 1648-59.
- Celli, S., Albert, M.L., Bousso, P. (2011): Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nat Med*. 17(6): 744-9.
- Ciftci, H.S., Tefik, T., Savran, M.K., Demir, E., Caliskan, Y., Ogret, Y.D., Nane, I. et al. (2019): Urinary CXCL9 and CXCL10 Levels and Acute Renal Graft Rejection. *International journal of organ transplantation medicine*. 10(2): 53-63.
- Constant, S.L. (1999): B lymphocytes as antigen-presenting cells for CD4+ T cell priming in vivo. *J Immunol*. 162(10): 5695-703.
- Cosio, F.G., Lager, D.J., Lorenz, E.C., Amer, H., Gloor, J.M., Stegall, M.D. (2010): Significance and implications of capillaritis during acute rejection of kidney allografts. *Transplantation*. 89(9): 1088-94.
- Couzi, L., Pitard, V., Moreau, J.F., Merville, P., Dechanet-Merville, J. (2015): Direct and indirect effects of cytomegalovirus-induced gammadelta T cells after kidney transplantation. *Front Immunol*: 6, 3.

- Crespo, E., Lucia, M., Cruzado, J.M., Luque, S., Melilli, E., Manonelles, A., et al. (2015): Pre-transplant donor-specific T-cell alloreactivity is strongly associated with early acute cellular rejection in kidney transplant recipients not receiving T-cell depleting induction therapy. *PLoS One*. 10: e0117618.
- Crespo, E., Cravedi, P., Martorell, J., et al. (2017): Posttransplant peripheral blood donor-specific interferon- γ enzyme-linked immune spot assay differentiates risk of subclinical rejection and de novo donor-specific alloantibodies in kidney transplant recipients. *Kidney International*. 92(1): 201-213.
- Crough, T., Khanna, R. (2009): Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*. 22: 76-98.
- De Freitas, D.G., Sellares, J., Mengel, M., Chang, J., Hidalgo, L.G., Famulski, K.S., Sis, B., Einecke, G., and Halloran, P.F. (2012): The nature of biopsies with „borderline rejection“ and prospects for eliminating this category. *Am J Transplant*. 12: 191-201.
- Decker, T., Muller, M., Stockinger, S. (2005): The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol*. 5: 675-687.
- Dolei, A., Pietropaolo, V., Gomes, E., et al. (2000): Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J Gen Virol*. 81: 1968-1973.
- Eid, A.J., Razonable, R.R. (2010): New developments in the management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Drugs*. 70(8): 968-81.
- Ekberg, H., Tedesco-Silva, H., Demirbas, A., et al. (2007): ELITE-Symphony Study. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med*. 357: 2562-2575.
- Ellis, S.L., Gysbers, V., Manders, P.M., Li, W., Hofer, M.J., Muller, M., et al. (2010): The cell-specific induction of CXC chemokine ligand 9 mediated by IFN- γ in microglia of the central nervous system is determined by the myeloid transcription factor PU.1. *J. Immunol*. 185: 1864-1877.
- Field, M., Lowe, D., Cobbold, M., et al. (2014): The use of NGAL and IP-10 in the prediction of early acute rejection in highly sensitized patients following HLA-incompatible renal transplantation. *Transpl Int*. 27: 362-70.
- Fisher, R.A. (2009): Cytomegalovirus infection and disease in the new era of immunosuppression following solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis*. 11(3): 195-202.
- Gaber, A.O., Matas, A.J., Henry, M.L, et al. (2012): Thymoglobulin Antibody Immunosuppression in Living Donor Recipients Investigators. Antithymocyte globulin induction in living donor renal transplant recipients: final report of the TAILOR registry. *Transplantation*. 94: 331-337.3.

- Game, D.S., Lechler, R.I. (2002): Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transplant Immunology*. 10(2-3), 101-8
- Ge, M.Q., Ho, A.W., Tang, Y., Wong, K.H., Chua, B.Y., Gasser, S., Kemeny, D.M. (2012): NK cells regulate CD8⁺ T cell priming and dendritic cell migration during influenza A infection by IFN- γ and perforin-dependent mechanisms. *J Immunol*. 189, 2099-2109
- Gloor, J.M., Cohen, A.J., Lager, D.J., et al. (2002): Subclinical rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. *Transplantation*. 73, 1965-1968
- Goldrath, A.W., Bogatzki, L.Y., Bevan, M.J. (2000): Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med*. 2000: 197(4), 557-564
- Grimbert, P., Hicham, M., Desvaux, D. et al. (2007): The Regulatory/Cytotoxic Graft-Infiltrating T Cells Differentiate Renal Allograft Borderline Change From Acute Rejection. *Transplantation*. 83(3): 341-346.
- Han, B., Logsdon, C.D. (1999): Cholecystokinin induction of mob-1 chemokine expression in pancreatic acinar cells requires NF- κ B activation. *Am J Physiol*. 277(pt 1): C74-C82.
- Hart, A., Smith, J.M., Skeans, M.A., Gustafson, S.K., Stewart, D.E., Cherikh, W.S., et al. (2016): Optn/Srtr 2014 annual data report kidney. *Am J Transplant*. 16(S2): 11–46.
- Hart, A., Smith, J.M., Skeans, M.A., et al. (2018): OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Kidney. *American Journal of Transplantation*. 18: 18-113.
- Hassanshahi, G., Jafarzadeh, A., Esmailzadeh, B., Arababadi, M.K., Yousefi, H., Dickson, A.J. (2008): Assessment of NK cells response to hepatocyte derived chemotactic agents. *Pak J Biol Sci*. 11: 1120-1125.
- Havenith, S.H.C., Remmerswaal, E.B.M., Bemelman, F.J. et al. (2012): Rapid T cell repopulation after rabbit anti-thymocyte globulin (rATG) treatment is driven mainly by cytomegalovirus: 1 Year Follow-up Data. *Immune Network*. 169(3): 292-301.
- He, H., Stone, J.R., Perkins, D.L. (2003): Analysis of differential immune responses induced by innate and adaptive immunity following transplantation. *Immunology*. 109(2): 185-96.
- Heeger, P.S., Greenspan, N.S., Kuhlenschmidt, S., DeJelo, C., Hricik, D.E., Schulak, J.A., et al. (1999): Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol*. 163: 2267–75.
- Heidt, S., Shankar, S., Muthusamy, A.S., et al. (2011): Pretransplant serum CXCL9 and CXCL10 levels fail to predict acute rejection in kidney transplant recipients receiving induction therapy. *Transplantation*. 91: 59–61.

- Heidt, S., Feltkamp, M.C., Karahan, G.E. et al. (2018): No evidence for cross-reactivity of virus-specific antibodies with HLA alloantigens. *Transplantation*. 102: 1844-1849.
- Henry, C.J., Ornelles, D.A., Mitchell, L.M., Brzoza-Lewis, K.L., Hiltbold, E.M. (2008): IL-12 produced by dendritic cells augments CD8⁺ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. *J Immunol*. 181(12): 8576–84.
- Hidalgo, L.G., Sis, B., Sellares, J., Campbell, P.M., Mengel, M., Einecke, G., Chang, J., Halloran, P.F. (2010): NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 10(8): 1812-22.
- Hirohashi, T., Chase, C.M., Della Pelle, P., Sebastian, D., Alessandrini, A., Madsen, J.C., Russell, P.S., Colvin, R.B. (2012): A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *Am J Transplant*. 12(2): 313-21.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., et al. (2005): Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature*. 434: 1035-1040.
- Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R.C., Bruford, E.A., Khodiyar, V.K., Lush, M. J., Povey, S., Talbot, C.C.J.R., Wright, M.W., et al. (2004): Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics*. 5 (12): 889-899.
- Hricik, D.E., Nickerson, P., Formica, R.N., et al. (2013): Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury. *Am J Transplant*. 13: 2634–44.
- Hricik, D.E., Poggio, E.D., Woodside, K.J., Sarabu, N., Sanchez, E.Q., Schulak, J.A., Padiyar, A., Heeger, P.S., Augustine, J.J. (2013): Effects of cellular sensitization and donor age on acute rejection and graft function after deceased-donor kidney transplantation. *Transplantation*. 95: 1254-1258.
- Hricik, D. E., Augustine, J., Nickerson, P., et al. (2015): Interferon Gamma ELISPOT Testing as a Risk-Stratifying Biomarker for Kidney Transplant Injury: Results From the CTOT-01 Multicenter Study. *American Journal of Transplantation*. 15(12): 3166-3173.
- Hricik, D.E., Formica, R.N., Nickerson, P., Rush, D., Fairchild, R.L., Poggio, E.D., Gibson, I.W., Wiebe, C., Tinckam, K., Bunnapradist, S., Samaniego-Picota, M., Brennan, D.C., Schröppel, B., Gaber, O., Armstrong, B., Ikle, D., Diop, H., Bridges, N.D., Heeger, P.S., Clinical Trials in Organ Transplantation-09 Consortium (2015): Adverse Outcomes of Tacrolimus Withdrawal in Immune-Quiescent Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol*. 26(12): 3114-22.
- Hrubá, P., Brabcová, G., Gueler, F., Krejčík, Z., Stranecký, V., Svobodová, E., Malusková, J., Gwinner, W., Honsova, E., Lodererova, A., Oberbauer, R., Zachoval, R., Viklický, O. (2015): Molecular diagnostics identifies risks for graft dysfunction despite borderline histologic changes. *Kidney Int*. 88: 785-795.

Hruba, P., Maluskova, J., Krejcik, Z., Merkerova-Dostalova, M., Stranecky, V., Klema, J., Osickova, K., Wohlfahrtova, M. Honsova, E., Viklicky, O. (2019): Borderline Changes in Kidney Allografts Represent a Non-Homogenous Cohort with Different Outcome. *Am J Transplant.* 19 (suppl 3).

Hu, H., Aizenstein, B.D., Puchalski, A., et al. (2004): Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction. *Am J Transplant.* 4: 432–7.

Humar, A., Lebranchu, Y., Vincenti, F., Blumberg, E.A., Punch, J.D., Limaye, A.P., et al. (2010): The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant CMV-Allo-specific cross-reactivity and transplantation recipients. *Am J Transplant.* 10(5): 1228-37.

Cherkassky, L., Lanning, M., Lalli, P. N., et al. (2011): Evaluation of Alloreactivity in Kidney Transplant Recipients Treated with Antithymocyte Globulin Versus IL-2 Receptor Blocker. *American Journal of Transplantation.* 11(7): 1388-1396. ISSN 16006135.

Chong, A.S., Alegre, M.L. (2012): The impact of infection and tissue damage in solid-organ transplantation. *Nat Rev Immunol.* 12(6): 459-71.

Chung, E.Y., Kim, B.H., Hong, J.T., Lee, C.K., Ahn, B., Nam, S.Y., et al. (2011): Resveratrol down-regulates interferon-gamma-inducible inflammatory genes in macrophages: molecular mechanism via decreased STAT-1 activation. *J. Nutr. Biochem.* 22: 902–909.

Ikeda, A., Aoki, N., Kido, M., Iwamoto, S., Nishiura, H., Maruoka, R., et al. (2014): Progression of autoimmune hepatitis is mediated by IL-18 - producing dendritic cells and hepatic CXCL9 expression in mice. *Hepatology.* 60: 224–236.

Ito, T., Wang, Y.H., Liu, Y.J. (2005): Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9., *Springer Semin Immunopathol.* 26: 221-229.

Iwasaki, A. a Medzhitov, R. (2010): Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* 327(5963): 291-5.

Jackson, J.A., Kim, E.J., Begley, B., et al. (2011): Urinary chemokines CXCL9 and CXCL10 are noninvasive markers of renal allograft rejection and BK viral infection. *Am J Transplant.* 11: 2228–34.

Jones, E.Y., Fugger, L., Strominger, J.L., Siebold, C. (2006): MHC class II proteins and disease: A structural perspective. *Nature Reviews Immunology.* 6: 271-282.

Katsuma, A.I., Yamakawa, T., Nakada, Y., Yamamoto, I. a Yokoo, T. (2017): Histopathological findings in transplanted kidneys. *Renal Replacement Therapy.* 3(1).

Kennard. S., Liu. H., Lilly. B. (2008): Transforming growth factor-beta (TGF- 1) down-regulates Notch3 in fibroblasts to promote smooth muscle gene expression. *J Biol Chem-* 283(3): 1324-33.

- Kolumam, G.A., Thomas, S., Thompson, L.J., Sprent, J., Murali-Krishna, K. (2005): Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med.* 202: 637-650.
- Krepsova, E., Tycova, I., Sekerkova, A., Wohlfahrt, P., Hrubá, P., Striz, I., Sawitzki, B. a Viklicky, O. (2015): Effect of induction therapy on the expression of molecular markers associated with rejection and tolerance. *BMC Nephrology.* 16(1). ISSN 1471-2369.
- Kumai, T., Nagato, T., Kobayashi, H., Komabayashi, Y., Ueda, S., Kishibe, K., Ohkuri, T., Takahara, M., Celis, E., Harabuchi, Y. (2015): CCL17 and CCL22/CCR4 signaling is a strong candidate for novel targeted therapy against nasal natural killer/T-cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother.* 64(6): 697–705.
- Kumar, A., Mohiuddin, A., Sharma, A., EL Kosi, M., Halawa, A. (2017): An Update on Crossmatch Techniques in Transplantation. *J Kidney* 3: 160.
- Lasagni, L., Francalanci, M., Annunziato, F., Lazzeri, E., Giannini, S., Cosmi, L., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Orlando, C., Maggi, E., Marra, F., Romagnani, S., Serio, M., Romagnani, P. (2003): An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med.* 197: 1537-1549.
- Lazzeri, E., Rotondi, M., Mazzinghi, B., et al. (2005): High CXCL10 expression in rejected kidneys and predictive role of pretransplant serum CXCL10 for acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Transplantation.* 79: 1215–20.
- Le, Y., Zhou, Y., Iribarren, P., Wang, J. (2004): Chemokines and chemokine receptors: Their manifold roles in homeostasis and disease. *Cellular & molecular immunology.* s. 95–104.
- Lefaucheur, C., Loupy, A., Hill, G.S., Andrade, J., Nochy, D., Antoine, C., Gautreau, C., Charron, D., Glotz, D., Suberbielle-Boissel, C. (2010): Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 21(8): 1398-406.
- Li, J., Deane, J.A., Campanale, N.V., Bertram, J.F., Ricardo, S.D. (2007): The contribution of bone marrow-derived cells to the development of renal interstitial fibrosis. *Stem Cells.* 25(3): 697-706.
- Li, X.C., Raghavan, M. (2010): Structure and function of major histocompatibility complex class I antigens. *Curr Opin Organ Transplant.* 15: 499–504.
- Lo, D.J., Weaver, T.A., Kleiner, D.E., Mannon, R.B., Jacobson, L.M., Becker, B.N., Swanson, S.J., Hale, D.A., Kirk, A.D. (2011): Chemokines and their receptors in human renal allotransplantation. *Transplantation.* 91(1): 70-7.
- Louis, K., Hertig, A., Taupin, J.C., et al. (2019): Markers of graft microvascular endothelial injury may identify harmful donor-specific anti-HLA antibodies and predict kidney allograft loss: Kidney. *American Journal of Transplantation.* 19(9): 2434-2445.

- Loupy, A., Lefaucheur, C., Vernerey, D. et al. (2013): Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med.* 369: 1215–1226.
- Loupy, A., Haas, M., Solez, K. et al. (2017): The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *American Journal of Transplantation.* 17(1), 28-41.
- Malheiro, J., Tafulo, S., Dias, L. et al. (2017): Impact on mid-term kidney graft outcomes of pretransplant anti-HLA antibodies detected by solid-phase assays: do donor-specific antibodies tell the whole story? *Hum Immunol.* 78: 526–533.
- Manuel, O., Husain, S., Kumar, D., et al. (2013): Assessment of Cytomegalovirus-Specific Cell-Mediated Immunity for the Prediction of Cytomegalovirus Disease in High-Risk Solid-Organ Transplant Recipients: A Multicenter Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases.* 56(6): 817-824.
- Marino, J., Babiker-Mohamed, M.H., Crosby-Bertorini, P., Paster, J.T., LeGuern, C., Germana, S., et al. (2016): Donor exosomes rather than passenger leukocytes initiate alloreactive T cell responses after transplantation. *Sci Immunol.* 1:8759.
- Matoza, J.R., Danguilan, R.A., Chicano, S. (2008): Impact of Banff borderline acute rejection among renal allograft recipients. *Transplant Proc.* 40: 2303–2306.
- Meehan, S.M., Siegel, C.T., Aronson, A.J. et al. (1999): The relationship of untreated borderline infiltrates by the Banff criteria to acute rejection in renal allograft biopsies. *J Am Soc Nephrol.* 10: 1806–1814.
- Michielsen, L.A., Wisse, B.W., Kamburova, E.G., et al. (2018): A paired kidney analysis on the impact of pre-transplant anti-HLA antibodies on graft survival. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 34: 1056–1063.
- Montero, N., Farouk, S., Gandolfini, I., et al. (2019): Pretransplant Donor-specific IFN γ ELISPOT as a Predictor of Graft Rejection. *Transplantation Direct.* 5(5): 63-68.
- Montgomery, J.R., Berger, J.C., Warren, D.S., James, N.T., Montgomery, R.A., Segev, D.L. (2012): Outcomes of ABO-incompatible kidney transplantation in the United States. *Transplantation.* 93(6): 603-9.
- Moreso, F., Hernández, D. (2013): Has the survival of the graft improved after renal transplantation in the era of modern immunosuppression? *Nefrologia.* 33: 1-154.
- Mourad, G., Glyda, M., Albano, L., et al. (2017): Advagraf-based immunosuppression regimen examining new onset diabetes mellitus in kidney transplant recipients (ADVANCE) study investigators. Incidence of Posttransplantation Diabetes Mellitus in De Novo Kidney Transplant Recipients Receiving Prolonged-Release Tacrolimus-Based Immunosuppression With 2 Different Corticosteroid Minimization Strategies: ADVANCE, A Randomized Controlled Trial. *Transplantation.* 101: 1924–1934.

- Nickel, P., Presber, F., Bold, G., Biti, D., Schonemann, C., Tullius, S.G., Volk, H.D., Reinke, P. (2004): Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. *Transplantation*. 78:1640-1646.
- Nocera, A., Tagliamacco, A., De Palma, R., Del Galdo, F., Ferrante, A., Fontana, I., Barocci, S., Ginevri, F., Rolla, D., Ravetti, J.L., Valente, U. (2004): Cytokine mRNA expression in chronically rejected human renal allografts. *Clin. Transplant*. 18(5): 564–570.
- Noorchashm, H., Reed, A.J., Rostami, S.Y., Mozaffari, R., Zekavat, G., Koeberlein, B., Caton, A.J., Najj, A. (2006): B cell-mediated antigen presentation is required for the pathogenesis of acute cardiac allograft rejection. *J Immunol*. 177(11):7715-22.
- Ochando, J.C., Krieger, N.R., Bromberg J.S. (2006): Direct versus indirect allorecognition: Visualization of dendritic cell distribution and interactions during rejection and tolerization. *Am J Transplant*. 6(10): 2488-96.
- Park, S.B., Kwark, J.H., Lee, K.T., et al. (2006): Polyoma virus-associated nephropathy and concurrent cytomegalovirus infection in the kidney transplant recipients. *Transplant Proc*. 38: 2059-2061.
- Pascual, J., Berger, S.P., Witzke, O., et al. (2018): TRANSFORM Investigators. Everolimus with Reduced Calcineurin Inhibitor Exposure in Renal Transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 29: 1979–1991.
- Patel, R., Terasaki, P. (1969): Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 280: 735–739.
- Platanias, L.C. (2005): Mechanisms of type- I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*. 5: 375-386.
- Ponciano, V.C., Renesto, P.G., Nogueira, E., Rangel, E.B., Cenedeze, M.A., Franco, M.F., Camara, N.O., Pacheco-Silva, A. (2007): Tim-3 expression in human kidney allografts. *Transpl. Immunol*. 17(3): p. 215–222.
- Pratschke, J., Stauch, D., Kotsch, K. (2009): Role of NK and NKT cells in solid organ transplantation. *Transpl Int*. 22(9): 859-68.
- Premasathian, N., Panorchan, K., Vongwiwatana, A., Pornpong, C., Agadmeck, S., Vejbaesya, S. (2008): The effect of peak and current serum panel-reactive antibody on graft survival. *Transplant Proc*. 40: 2200-1.
- Rabant, M.L., Amrouche, L., Morin, et al. (2016): Early Low Urinary CXCL9 and CXCL10 Might Predict Immunological Quiescence in Clinically and Histologically Stable Kidney Recipients. *American Journal of Transplantation*. 16(6): 1868-1881.

- Raisanen-Sokolowski, A., Glysing-Jensen, T., Koglin, J., Russell, M.E. (1998): Reduced transplant arteriosclerosis in murine cardiac allografts placed in interferon-gamma knockout recipients. *Am J Pathol.* 152: 359-365.
- Rebellato, L.M., Ozawa, M., Verbanac, K.M., Catrou, P., Haisch, C.E., Terasaki, P.I. (2006): Clinical and anti-HLA antibody profile of nine renal transplant recipients with failed grafts: donor-specific and non-donor-specific antibody development. *Clin Transpl.* 241-53.
- Regele, H., Bohmig, G.A., Habicht, A., Gollowitzer, D., Schillinger, M., Rockenschaub, S., et al. (2002): Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 13(9): 2371-80.
- Reinsmoen, N.L., Cornett, K.M., Kloehn, R., Burnette, A.D., McHugh, L., Flewellen, B.K., Matas, A., Savik, K. (2008): Pretransplant donor-specific and non-specific immune parameters associated with early acute rejection. *Transplantation.* 85: 462-470.
- Richter, R., Susal, C., Köhler, S. et al (2016): Pretransplant human leukocyte antigen antibodies detected by single-antigen bead assay are a risk factor for long-term kidney graft loss even in the absence of donor-specific antibodies. *Transpl Int.* 29: 988-998.
- Robb, R.J. a Hill, G.R. (2012): The interferon-dependent orchestration of innate and adaptive immunity after transplantation. *Blood.* 119(23): 5351-5358.
- Rossini, M., Cheunsuchon, B., Donnert, E., Ma, L.J., Thomas, J.W., Neilson, E.G., Fogo, A.B. (2005): Immunolocalization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), its receptor (FGFR-1), and fibroblast-specific protein-1 (FSP-1) in inflammatory renal disease. *Kidney Int.* 68(6): 2621-8.
- Rush, D.N., Jeffery, J.R., and Gough, J. (1995): Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation.* 59: 511-514.
- Russo, V., Zhou, D., Sartirana, C., Rovere, P., Villa, A., Rossini, S., et al. (2000): Acquisition of intact allogeneic human leukocyte antigen molecules by human dendritic cells. *Blood.* 95: 3473-7.
- Sellares, J., de Freitas, D.G., Mengel, M. et al. (2012): Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant.* 12: 388-399.
- Selvey, L.A., Lim, W.H., Boan, P., Swaminathan, R., Slimings, C., Harrison, A.E., et al. (2017): Cytomegalovirus viraemia and mortality in renal transplant recipients in the era of antiviral prophylaxis. Lessons from the western Australian experience. *BMC Infect Dis.* 17(1): 501.

Shahbazi, F., Ranjbaran, M., Karami-Far, S., et al. (2015): Graft survival rate of renal transplantation during a period of 10 years in Iran: Kidney. *Journal of Research in Medical Sciences*. 20(11): 18-113.

Schaub, S., Nickerson, P., Rush, D., Mayr, M., Hess, C., Golian, M., Stefura, W., Hayglass, K. (2009): Urinary CXCL9 and CXCL10 levels correlate with the extent of subclinical tubulitis. *Am J Transplant*. 9(6): 1347-53.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 75: 163-189.

Schweitzer, E.J., Drachenberg, C.B., Anderson, L. et al. (1996): Significance of the Banff borderline biopsy. *Am J Kidney Dis*. 28: 585–588.

Sis, B., Jhangri, G.S., Bunnag, S., Allanach, K., Kaplan, B., Halloran, P.F. (2009): Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant*. 9(10): 2312-23.

Siu, J.H.Y., Surendrakumar, V., Richards, J.A., Pettigrew, G.J. (2018): T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. *Front. Immunol*. 9: 2548.

Slavcev, A., Rybakova, K., Svobodova, E., et al. (2015): Pre-transplant donor-specific Interferon-gamma-producing cells and acute rejection of the kidney allograft. *Transplant Immunology*. 33(2): 63-68.

Solez, K., Axelsen, R.A., Benediktsson, H., et al. (1993): International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*. 44: 411–422.

Stranavova, L., Hrubá, P., Girmanova, E., Tycová, I., Slavcev, A., Fronek, J., et al. (2018): The Effect of Induction Therapy on Established CMV Specific T Cell Immunity in Living Donor Kidney Transplantation. *Physiological Research*. 67: 251-260.

Stranavova, L., Pelak, O., Svaton, M., et al. (2019): Heterologous Cytomegalovirus and Allo-Reactivity by Shared T Cell Receptor Repertoire in Kidney Transplantation. *Frontiers in Immunology*. 10. ISSN 1664-3224.

Strieter, R.M., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J., Dzuiba, J., van Damme, J., Walz, A., Marriott, D., et al (1995): The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 270: 27348-27357.

Stríž, I. a Holán, V. (2015): *Cytokiny v klinické medicíně*. Praha: Maxdorf. Jessenius. ISBN 978-807-3454-272.

Terasaki, P.I., Ozawa, M. (2004): Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant*. 4(3): 438-43.

Van Raemdonck, K., Van den Steen, P.E., Liekens, S., Van Damme, J., Struyf, S. (2015): CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 26: 311–327.

Viklický, O., Janoušek, L., Baláž, P. (2008): Transplantace ledviny v klinické praxi. Grada. ISBN 978-80-247-2455-3.

Wang, Y., Dai, H., Liu, Z., Cheng, X., Tellides, G., Dai, Z. (2006): Neutralizing IL-7 promotes long-term allograft survival induced by CD40/CD40L costimulatory blockade. *Am J Transplant.* 6(12): 2851-60.

Webster, A.C., Woodroffe, R.C., Taylor, R.S., et al. (2005): Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ.* 331: 810.

Whiting, D., Hsieh, G., Yun, J.J., Banerji, A., Yao, W., Fishbein, M.C., Belperio, J., Strieter, R.M., Bonavida, B., Ardehali, A. (2004): Chemokine monokine induced by IFN-gamma/CXC chemokine ligand 9 stimulates T lymphocyte proliferation and effector cytokine production. *J. Immunol.* 172: 7417–7424.

Whitmire, J.K., Tan, J.T., Whitton, J.L. (2005): Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med.* 201: 1053-1059.

Wiebe, C., Gibson, I.W., Blydt-Hansen, T.D., Karpinski, M., Ho, J., Storsley, L.J., et al. (2012): Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant.* 12(5): 1157–67.

Wirnsberger, G., Hebenstreit, D., Posselt, G., Horejs-Hoeck, J., Duschl, A. (2006): IL-4 induces expression of TARC/CCL17 via two STAT6 binding sites. *Eur J Immunol.* 36(7): 1882.

Worsley, C.M., Mayne, E.S., Suchard, M.S. (2011): Luminex-based virtual crossmatching for renal transplantation in South Africa. *S Afr Med J.* 102: 40-3.

Yang, W.S., Han, N.J., Kim, C.S., Ahn, H., Lee, S.K., Lee, K.U., Park, S.K. (2005): STAT1-independent down-regulation of interferon-gamma-induced class II transactivator and HLA-DR expression by transforming growth factor beta-1 in human glomerular endothelial cells. *Nephron Exp Nephrol.* 100(3): e124-31.

Yuan, X., Ansari, M.J., D'Addio, F., Paez-Cortez, J., Schmitt, I., Donnarumma, M., Boenisch, O., Zhao, X., Popoola, J., Clarkson, M.R., Yagita, H., Akiba, H., Freeman, G.J., Iacomini, J., Turka, L.A., Glimcher, L.H., Sayegh, M.H. (2009): Targeting Tim-1 to overcome resistance to transplantation tolerance mediated by CD8 T17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(26): 10734-9.

Zhang, L.J., Hanff, P., Rutherford, C., Churchill, W.H., Crumpacker, C.S. (1995): Detection of human cytomegalovirus DNA, RNA, and antibody in normal donor blood. *J Infect Dis.* 171(4): 1002-6.